北京沃凯生物科技有限公司
全国免费电话:400-819-385
www.bjoka-vip.com
Tel:010-62971590. Fax:62340519
M-ail:postmaster@oka-vip.com

3-磷酸甘油醛脱氢酶(Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase，GAPDH)试剂盒说明书

分光光度法 50 管/48 样

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义

GAPDH 催化 3-磷酸甘油醛氧化生成 1,3-二磷酸甘油酸，是糖酵解途径的关键酶，与糖异生途径、体内血糖浓度的维持和糖尿病的发生密切相关，在机体糖、脂、蛋白代谢紊乱疾病中发挥重要作用。

测定原理

3-磷酸甘油酸激酶催化三磷酸甘油酸和 ATP 生成 1,3 二磷酸甘油酸。GAPDH 逆向催化 1,3 二磷酸甘油酸和 NADH 生成 3 磷酸甘油醛、无机磷和 NAD，340nm 处测定 NADH 的减少量可反映 GADPH 活性的高低。

需自备的仪器和用品

分光光度计、恒温水浴锅、台式离心机、可调式移液器、1 mL 石英比色皿、研钵、冰和蒸馏水。

试剂的组成和配制

提取液一：液体 50mL×1 瓶，4℃保存。
提取液二：液体 50mL×1 瓶，4℃保存。
试剂一：粉剂×1 瓶，-20℃保存；
试剂二：液体 50mL×1 瓶，4℃保存；
试剂三：液体 28μL×1 支，4℃保存；

组织样本的前处理

①总 GAPDH 酶提取：建议称取约 0.1g 样本，加入 1mL 提取液一，冰浴匀浆后超声破碎（冰浴，200W，破碎 3s，间歇 7s，总时间 1min），然后 4℃，8000g 离心 10min，取上清测定。

②胞浆和叶绿体 GAPDH 酶的分离：按照植物组织质量（g）：提取液体积(mL)为 1：5～10 的比例（建议称取约 0.1g 样本，加入 1mL 提取液一），冰浴匀浆后于 4℃，200g 离心 5min，弃沉淀，取上清在 4℃，8000g 离心 10min，**取上清用于测定胞浆 GAPDH 酶活性**，取沉淀加 1mL 提取液二，震荡溶解后超声破碎（冰浴，200W，破碎 3s，间歇 7s，总时间 1min），然后 4℃，8000g 离心 10min，**取上清测定叶绿体中 GAPDH 酶活性。**

建议测定总 GAPDH 酶活性，按照步骤①提取粗酶液，若需要分别测定胞浆和叶绿体中的 GAPDH，则按照步骤②提取粗酶液。

细菌或培养细胞的前处理

先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；按照细菌或细胞数量（10^4 个）：提取液一体积（mL）为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液一），超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 20%或 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；8000g 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

测定步骤

1、 分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 340nm，蒸馏水调零。

2、 样本测定

（1）工作液的配制：将试剂二全部倒入试剂一瓶中，充分溶解，37℃(哺乳动物)或 25℃(其它物种)预热 10 分钟；用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融。

（2）在试剂三中加入 1mL 蒸馏水，充分混匀待用；用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融。

（3）在 1mL 石英比色皿中加入 30μL 样本、20μL 试剂三和 950μL 工作液，混匀，加入最后一个试剂的同时开始计时，记录 340nm 处 20s 时的吸光值 A1 和 5min20s 后的吸光值 A2，计算 ΔA=A1-A2。

GAPDH 活性计算

（1）按样本蛋白浓度计算

单位的定义：每 mg 组织蛋白每分钟消耗 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

GAPDH（nmol/min/mg prot）＝[ΔA×V 反总÷（ε×d）×10^9]÷(V 样×Cpr) ÷T=1072×ΔA÷Cpr

（2）按样本鲜重计算

单位的定义：每 g 组织每分钟消耗 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

GAPDH（nmol/min/g 鲜重）＝[ΔA×V 反总÷（ε×d）×10^9]÷(W ×V 样÷V 样总) ÷T=1072×ΔA÷W

（3）按细菌或细胞密度计算

单位的定义：每一万个细菌或细胞每分钟消耗 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

GAPDH（nmol/min/10^4 cell）＝[ΔA×V 反总÷（ε×d）×10^9]÷(500 ×V 样÷V 样总) ÷T=2.144×ΔA

V 反总：反应体系总体积，1×10^{-3} L；ε：NADH 摩尔消光系数，6.22×10^3 L / mol /cm；d：比色皿光径，1cm；V 样：加入样本体积，0.03 mL；V 样总：加入提取液体积，1 mL；T：反应时间，5 min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；500：细菌或细胞总数，500 万。