

上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0487

Size: 100T/96S

3-磷酸甘油醛脱氢酶 (GAPDH) 检测试剂盒说明书

微量法

*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

一、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。

二、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 GAPDH 活性的高低。

三、需自备的仪器和用品：

分光光度计/酶标仪、恒温水浴锅、台式离心机、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔板、研钵、冰和蒸馏水。

四、试剂的组成和配置：

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液	100mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉剂×1 瓶	-20℃保存	
试剂二	液体 20mL×1 瓶	4℃保存	
试剂三	液体×1 支	4℃保存	

五、样本的前处理

1、细菌或培养细胞：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)，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。

2、组织：按照组织质量(g)：提取液体积(mL)为 1: 5~10 的比例(建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液)，进行冰浴匀浆。8000g 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

六、测定步骤

1、分光光度计或酶标仪预热 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；现配现用。

(2) 在试剂三中加入 500 μL 蒸馏水，充分混匀待用；用不完的试剂 4℃保存一周。

(3) 在微量石英比色皿或 96 孔板中加入 5 μL 样本、5 μL 试剂三和 190 μL 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 $\Delta A = A1 - A2$ 。

七、GAPDH 活性计算

● 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

(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 1nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{GAPDH (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T$$
$$= 1286 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

(2) 按样本鲜重计算

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

$$\text{GAPDH (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$
$$= 1286 \times \Delta A \div W$$

(3) 按细菌或细胞密度计算

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

$$\text{GAPDH (nmol/min/10}^4\text{cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 2.57 \times \Delta A$$

V 反总：反应体系总体积， 2×10^{-4} 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，0.005 mL；V 样总：加入提取液体积，1mL；
T：反应时间，5min；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。

● 用 96 孔板测定的计算公式如下

(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 1nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{GAPDH (nmol/min/mg prot)} &= [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \\ &= 2572 \times \Delta A \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

(2) 按样本鲜重计算

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

$$\begin{aligned} \text{GAPDH (nmol/min/g 鲜重)} &= [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 2572 \times \Delta A \div W \end{aligned}$$

(3) 按细菌或细胞密度计算

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

$$\text{GAPDH (nmol/min/10}^4\text{cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 5.144 \times \Delta A$$

V 反总：反应体系总体积， 2×10^{-4} L； ϵ ：NADH 摩尔消光系数， 6.22×10^3 L/mol/cm；
d：96 孔板光径，0.5cm；V 样：加入样本体积，0.005 mL；V 样总：加入提取液体积，1mL；
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。