



## 叶绿体3-磷酸甘油醛脱氢酶(NADPH-GAPDH)试剂盒

### 紫外分光光度法

货号: R43991-24S/48S

#### 产品简介:

3-磷酸甘油醛脱氢酶分为胞质型和质体型, 植物叶绿体中的 3-磷酸甘油醛脱氢酶 (EC 1.2. 1. 13) 属于是质体型, 多以 NADPH 为辅酶, 催化糖酵解的逆反应, 将 1,3二磷酸甘油酸还原为 3 磷酸甘油醛, 该酶在同化 CO<sub>2</sub> 的卡尔文循环中起中心作用。

利用GAPDH 逆向催化 1,3 二磷酸甘油酸和 NADPH 生成 3 磷酸甘油醛和 NADP<sup>+</sup>, 于340nm 处测定 NADPH 的下降速率即可得出叶绿体中 NADPH-GAPDH 酶活性的高低。

#### 试剂盒的组成和配制:

| 试剂名称 | R43991-24S   | 保存要求   | 备注                                                                |
|------|--------------|--------|-------------------------------------------------------------------|
| 提取液一 | 液体 30mL×1 瓶  | 4℃保存   |                                                                   |
| 提取液二 | 液体 30mL×1 瓶  | 4℃保存   |                                                                   |
| 试剂一  | 粉剂 mg×1 支    | 4℃保存   | 用前甩几下或离心使试剂落入底部, 再加 0.6mL 蒸馏水溶解备用。                                |
| 试剂二  | 粉剂 mg×2 支    | -20℃保存 | 用前甩几下或离心使试剂落入底部, 每支加 0.4mL 蒸馏水溶解, 用不完的试剂分装后-20℃保存, 禁止反复冻融, 三天内用完。 |
| 试剂三  | 液体μL×1 支     | -20℃保存 | 用前甩几下或离心使试剂落入底部, 再加0.6mL 蒸馏水溶解备用。可-20℃分装冻存。                       |
| 试剂四  | 液体 18mL×1 瓶  | 4℃保存   |                                                                   |
| 试剂五  | 液体 0.6mL×1 支 | 4℃保存   |                                                                   |

| 试剂名称 | R43991-48S  | 保存要求 | 备注 |
|------|-------------|------|----|
| 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 mg×1 支    | 4℃ 保存   | 用前甩几下或离心使试剂落入底部，再加 1.1mL 蒸馏水溶解备用。                              |
| 试剂二 | 粉剂 mg×3 支    | -20℃ 保存 | 用前甩几下或离心使试剂落入底部，每支加 0.4mL 蒸馏水溶解，用不完的试剂分装后-20℃ 保存，禁止反复冻融，三天内用完。 |
| 试剂三 | 液体 μL×1 支    | -20℃ 保存 | 用前甩几下或离心使试剂落入底部，再加 1.1mL 蒸馏水溶解备用。可-20℃ 分装冻存。                   |
| 试剂四 | 液体 30mL×1 瓶  | 4℃ 保存   |                                                                |
| 试剂五 | 液体 1.1mL×1 支 | 4℃ 保存   |                                                                |

### 所需的仪器和用品:

紫外分光光度计、1mL 石英比色皿（光径 1cm）、可调式移液器、天平、震荡仪、水浴锅、低温离心机、研钵。

### 叶绿体 3-磷酸甘油醛脱氢酶(NADPH-GAPDH)活性测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

#### 1、样本制备:

##### ① 组织样本:

称取约 0.2g 样本，加入 1mL 提取液一，快速冰浴匀浆后于 4℃，1600rpm 离心 5min，弃沉淀，取上清再 4℃，5000rpm 离心 15min，弃上清留沉淀，向沉淀中加 1mL 提取液二，强力涡旋震荡 15s，置于冰上(或冰箱)孵育 15min，在 4℃，13000rpm 离心 5min，取上清测定叶绿体中 3-磷酸甘油醛脱氢酶(NADPH-GAPDH)的酶活性。提示：整个叶绿体的提取过程须保持 4℃ 低温环境。

【注】：若增加样本量，可按照组织质量（g）：提取液体积(mL)为 1：5~10 的比例进行提取。

##### ② 液体样品：澄清的液体样本直接检测；若浑浊则离心后取上清液检测。

#### 2、上机检测:



① 紫外分光光度计预热 30min，调节波长至 340nm，设定温度 25℃，蒸馏水调零。

② 所有试剂解冻至室温（25℃），或可放在 25℃ 条件下水浴 5- 15min。

③ 试剂一和二和三和四可按照 20:20:20:580 比例配成混合液（一枪加 640μL 该混合液）（该混合液用多少配多少，现配现用）。

④ 在 1mL 石英比色皿（光径 1cm）中依次加入：

| 试剂名称 (μL)                                                                    | 测定管 |
|------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 样本                                                                           | 60  |
| 试剂一                                                                          | 20  |
| 试剂二                                                                          | 20  |
| 试剂三                                                                          | 20  |
| 试剂四                                                                          | 580 |
| 混匀，室温（25℃）条件下，孵育 10min                                                       |     |
| 试剂五                                                                          | 20  |
| 轻轻混匀，室温（25℃）条件下，30s 时于 340nm 处读取吸光值 A1，10min 后再读取 A2， $\Delta A = A1 - A2$ 。 |     |

#### 结果计算：

1、按照样本蛋白浓度计算：

酶活定义：每毫克组织蛋白每分钟消耗 1 nmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NADPH-GAPDH}(\text{nmol/min/mg prot}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (V1 \times C_{pr}) \div T \\ = 193 \times \Delta A \div C_{pr}$$

2、按照样本质量计算：

酶活定义：每克组织每分钟消耗 1 nmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NADPH-GAPDH}(\text{nmol/min/g 鲜重}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T \\ = 193 \times \Delta A \div W$$

3、按照液体体积计算：

酶活定义：每毫升液体每分钟消耗 1 nmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。



$$\text{NADPH-GAPDH}(\text{nmol/min/mL}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times 10^9] \div V_1 \div T$$
$$= 193 \times \Delta A$$

$\epsilon$ ---NADPH 摩尔消光系数,  $6.22 \times 10^3 \text{ L / mol / cm}$ ;

$d$ ---比色皿光径, 1cm;

$V$ ---加入提取液体积, 1mL;

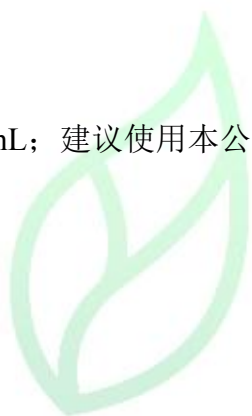
$V_1$ ---加入样本体积, 0.06mL;

$V_2$ ---反应体系总体积,  $0.72\text{mL} = 7.2 \times 10^{-4}\text{L}$ ;

$T$ ---反应时间, 10min;

$W$ ---样本质量, g;

$C_{pr}$ ---样本蛋白质浓度, mg/mL; 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。



源叶