



3-磷酸甘油醛脱氢酶(NADH-GAPDH)试剂盒

紫外分光光度法

货号: R45054-24S/48S

产品简介:

3-磷酸甘油醛脱氢酶分为胞质型和质体型, 细胞质中的3-磷酸甘油醛脱氢酶(EC 1.2.1.12)是糖酵解的中枢环节之一, 特异的以 NADH 为辅酶, 催化3磷酸甘油醛形成1,3二磷酸甘油酸的可逆反应, 与糖异生途径及体内血糖浓度的维持、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。

本试剂盒耦联3-磷酸甘油酸激酶, 以三磷酸甘油酸为底物, 于340nm 处测定 NADH 的下降速率来得出NADH-GAPDH 酶活性的大小。

试剂盒的组成和配制:

试剂名称	R45054-24S	保存要求	备注
提取液	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, 每支再加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	R45054-48S	保存要求	备注
提取液	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×2支	-20℃保存	用前甩几下或离心使试剂落入底部, 每支再加0.6mL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。

3-磷酸甘油醛脱氢酶(NADH-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0.1g 组织样本,加入1mL 提取液,冰浴匀浆,12000rpm,4℃离心10min,取上清,置冰上待测。

【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细菌/细胞样本:先收集细菌或细胞到离心管内,离心后弃上清;取约500万细菌或细胞加入1mL 提取液,超声波破碎(冰浴,功率200W,超声3s,间隔10s,重复30次);12000rpm,4℃离心10min,取上清,置冰上待测。

【注】:若增加样本量,可按照细菌或细胞数量(10^4 个):提取液体积(mL) 为500~1000:1比例提取。

③液体样本(如血清):直接检测;若浑浊,离心后取上清检测。

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640 μ L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1nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

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

2、按照样本质量计算：

酶活定义：每克组织每分消耗1nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

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

3、按细菌或细胞密度计算：

酶活定义：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。

$$\text{NADH-GAPDH}(\text{nmol/min}/10^4\text{cell}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V) \div T \\ = 0.39 \times \Delta A$$

4、按液体体积计算：

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

$$\text{NADH-GAPDH}(\text{nmol/min/mL}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div V1 \div T$$



$$=193 \times \Delta A$$

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

d--- 光径, 1cm;

V---加入提取液体积, 1mL;

V1---加入样本体积, 0.06mL;

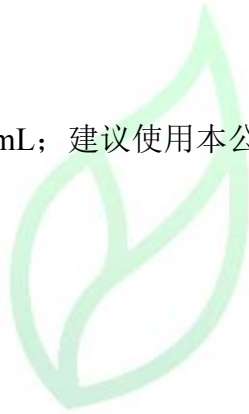
V2---反应体系总体积, $0.72\text{mL} = 7.2 \times 10^{-4}\text{L}$;

T--反应时间, 10min;

W---样本质量, g;

500---细菌或细胞数量, 万;

Cpr--- 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