

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

微量法 100管/96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/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。

试剂的组成和配制

提取液一：液体100mL×1瓶，4℃保存。

提取液二：液体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14uL×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（10⁴个）：提取液一（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；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500 μ L蒸馏水，充分混匀待用；用不完的试剂分装后-20 $^{\circ}$ C保存，禁止反复冻融。

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

GAPDH活性计算

a.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1 nmol的NADH定义为一个酶活力单位。

$$\text{GAPDH (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 1286 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

(2) 按样本鲜重计算

单位的定义：每g组织每分钟消耗1 nmol的NADH定义为一个酶活力单位。

$$\text{GAPDH (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1286 \times \Delta A \div W$$

(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。

$$\text{GAPDH (nmol/min/104 cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 2.572 \times \Delta A$$

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，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。

b.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1 nmol的NADH定义为一个酶活力单位。

$$\text{GAPDH (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 2572 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

(2) 按样本鲜重计算

单位的定义：每g组织每分钟消耗1 nmol的NADH定义为一个酶活力单位。

$$\text{GAPDH (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 2572 \times \Delta A \div W$$

(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。

$$\text{GAPDH (nmol/min/104 cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 5.144 \times \Delta A$$

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，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。