

天
净
沙
系
列

CAT#:7-01022
常温运输和保存

BINGENE

甘油醛-3-磷酸脱氢酶活性测定试剂盒

使用手册 V1.0

江苏天净沙基因诊断技术有限公司

网址: www.bingene.com; 电话: 400-6605850; 电邮: order@bingene.com

产品及特点	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 活性的低。			
规格及成分	本产品使用塑料袋包装			
	成份	编号	规格	包装材料
	提取液体一	7-01022	100mL×1	本色瓶
	取液二	7-01022	100mL×1	本色瓶
	剂一	7-01022	粉剂×1	本色瓶
	试剂二	7-01022	20mL×1	本色瓶
	试剂三	7-01022	14uL×1	本色瓶
	使用手册	7-01022sc	1 份	无
运输及保存	-20℃运输和保存，有效期一年。			
自备试剂	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。			
使用方法	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、包浆和绿叶体 GAPDH 酶的分离:按照植物组织质量(g):提取液体积(mL)为 15~10 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 取上清用于测定包浆 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，若需要分别测定包浆和叶绿体中的 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 μL 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. 在微量石英比色皿或 96 孔板中加入 5μL 样本、5μL 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 $\Delta A = A1 - A2$ 。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 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。
- $$\text{GAPDH (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 1286 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$
- 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。
- $$\text{GAPDH (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1286 \times \Delta A \div W$$
- 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。
- $$\text{GAPDH (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 2.572 \times \Delta A \times V_{\text{反总}} \div W$$
- 反总：反应体系总体积，2×10⁻⁴ L；ε：NADH 摩尔消光系数，6.22×10³ 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。

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。 $\text{GAPDH (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 2572 \times \Delta A \div \text{Cpr}$ 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。 $\text{GAPDH (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 2572 \times \Delta A \div W$ (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, 6.22×10³ 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。
--	--