

## 3-磷酸甘油氧化酶（GPO）活性测定试剂盒说明书

（货号：ADS-W-T029 微板法 96 样）

### 一、产品简介：

3-磷酸甘油(G3P)被 3-磷酸甘油氧化酶(GPO)氧化生成过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)，H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 与 4-氨基氨替吡啉等反应生成红色醌类化合物，其在 510nm 处有特征吸收峰，通过检测 510nm 处吸光值变化即可得出 3-磷酸甘油氧化酶(GPO)活性大小。

### 二、试剂盒的组成和配制：

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 100mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉剂 1 支	4℃保存	临用前甩几下或离心使粉剂落入底部，再加 1.2mL 蒸馏水溶解备用，可 -20℃分装冻存。
试剂二	液体 12mL×1 瓶	4℃保存	
试剂三	液体 7mL×1 瓶	4℃保存	
标准品	液体 1mL×1 支	4℃保存	若重新做标曲，则用到该试剂。

### 三、所需的仪器和用品：

酶标仪、台式离心机、可调式移液器、96 孔板、研钵、冰和蒸馏水。

### 四、3-磷酸甘油氧化酶(GPO)含量测定：

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：取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液，进行冰浴匀浆。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 细菌或细胞：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，超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 20%或 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；12000 rpm，4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照细菌/细胞数量(10<sup>4</sup>)：提取液(mL)为 500~1000：1 的比例进行提取。

③ 液体样本：直接检测；若浑浊，离心后取上清检测。

#### 2、上机检测：

① 酶标仪预热 30min，调节波长到 510 nm。

② 所有试剂解冻至 37℃或于 37℃水浴锅中水浴 5-10min。

③ 在 96 孔板中依次加入：

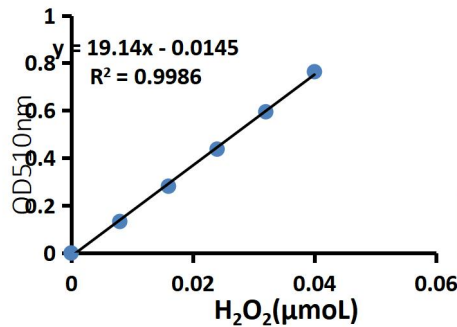
试剂名称 (μL)	测定管
样本	20
试剂一	10
试剂二	110
试剂三	60
混匀，立即于 510nm 处读取 A1，37℃孵育 30min 后读取 A2， $\Delta A=A2-A1$ 。	

【注】1.若 $\Delta A$ 较小，可以增加反应时间 T（如增至 1 小时），或增加样本量 V1（由 20μL 增至 50μL，则试剂二相应减少），则改变后的 T 和 V1 需重新代入公式计算。

2.  $\Delta A$  最好控制在标准曲线的线性范围内, 若  $\Delta A$  的值超过 1, 可对样本进行稀释再测定, 稀释倍数  $D$  代入公式计算; 或减少样本量  $V_1$  (如减至  $10\mu\text{L}$ , 则试剂二相应增加), 或减少反应时间  $T$  (如减至  $10\text{min}$ ), 则改变后的  $T$ 、 $V_1$  和稀释倍数  $D$  需重新代入公式计算。

## 五、结果计算:

1、标准曲线方程为  $y = 19.14x - 0.0145$ ;  $x$  为标准品摩尔质量 ( $\mu\text{mol}$ ),  $y$  为  $\Delta A$ 。



2、按照样本质量计算:

酶活定义: 每克组织每分钟分解底物生成  $1\text{nmol}$  的  $\text{H}_2\text{O}_2$  定义为一个酶活单位(U)。

$$\text{GPO 活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0145) \div 19.14 \times 10^3] \div (W \times V_1 \div V) \div T \times D$$

$$= 87 \times (\Delta A + 0.0145) \div W \times D$$

2、按照样本蛋白浓度计算:

酶活定义: 每毫克组织蛋白每分钟分解底物生成  $1\text{nmol}$  的  $\text{H}_2\text{O}_2$  定义为一个酶活单位(U)。

$$\text{GPO 活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [(\Delta A + 0.0145) \div 19.14 \times 10^3] \div (Cpr \times V_1) \div T \times D$$

$$= 87 \times (\Delta A + 0.0145) \div Cpr \times D$$

3、按细胞数量计算:

酶活定义: 每  $10^4$  个细胞每分钟分解底物生成  $1\text{nmol}$  的  $\text{H}_2\text{O}_2$  定义为一个酶活单位(U)。

$$\text{GPO 活性}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0145) \div 19.14 \times 10^3] \div (500 \times V_1 \div V) \div T \times D$$

$$= 87 \times (\Delta A + 0.0145) \div 500 \times D$$

4、按液体体积计算:

酶活定义: 每毫升液体每分钟分解底物生成  $1\text{nmol}$  的  $\text{H}_2\text{O}_2$  定义为一个酶活单位(U)。

$$\text{GPO 活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}) = [(\Delta A + 0.0145) \div 19.14 \times 10^3] \div V_1 \div T \times D = 87 \times (\Delta A + 0.0145) \times D$$

W---样品质量, g;

V---提取液体积, 1 mL;

V1---上清液体积 (mL), 0.02mL;

T---反应时间, 30 min;

D---稀释倍数, 未稀释即为 1;

500---细胞数量, 万;

Cpr---上清液蛋白质浓度, mg/mL; 建议使用本公司的 BCA 蛋白质含量测定试剂盒。

附: 标准曲线制作过程:

- 1 标准品浓度: 试剂盒所带标准品母液浓度为  $250\text{mM}$ 。
- 2 把母液用蒸馏水稀释成以下浓度梯度的标准品:  $0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2\text{mM}$ 。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 依据测定管加样体系, 于  $510\text{nm}$  处测定; 根据结果即可制作标准曲线。