

胞浆-3-磷酸甘油脱氢酶 (ctGPD) 活性测定试剂盒说明书

(货号: ADS-W-T021 微板法 96 样)

一、产品简介:

胞浆-3-磷酸甘油脱氢酶 (ctGPD, EC 1.1.1.8) 的酶活水平直接决定了葡萄糖分解代谢过程中向甘油合成方向的物质流分配量, 也因此决定甘油的生成水平。

ctGPD 为 NAD 依赖型, 催化磷酸二羟丙酮生成 3-磷酸甘油。通过 340nm 下测定 NADH 的下降量, 进而得出 ctGPD 的酶活性大小。

二、试剂盒组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 100mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	粉剂 3 支	-20°C保存	使用前甩几下或离心使粉剂落入底部, 每支分别加 0.44mL 蒸馏水溶解备用。用不完的试剂-20°C保存, 禁止反复冻融, 三天内用完。
试剂二	液体 17mL×1 瓶	4°C保存	
试剂三	粉剂 1 支	4°C保存	使用前甩几下或离心使粉剂落入底部, 加 1.1mL 蒸馏水充分溶解。

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、可调试移液器、台式离心机、水浴锅、研钵、冰和蒸馏水。

四、胞浆-3-磷酸甘油脱氢酶 (ctGPD) 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: 取约 0.1g 组织 (水分充足的样本可取 0.5g) 到研钵内, 加入 1mL 提取液, 在冰上进行冰浴匀浆或者液氮研磨。12000rpm, 4°C离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 也可以按照组织质量 (g): 提取液体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例提取)

② 细菌/真菌样本:

先收集细菌/真菌到离心管内, 离心后弃上清; 取 500 万细菌/真菌加入 1mL 提取液; 冰浴超声波破碎细菌/真菌 (冰浴, 功率 20% 或 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次); 12000rpm, 4°C离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 也可按照细菌或细胞数量 (10^4 个): 提取液体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例进行提取)

③ 液体样本: 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 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 340nm。

② 在 96 孔板中依次加入下列试剂:

试剂名称 (μL)	测定管
样本	20
试剂一	10
试剂二	160
试剂三	10

混匀后立即在 340nm 处读取 A1 值，5min 后读取 A2。
 $\Delta A = A1 - A2$ 。

【注】：加完试剂三即启动反应，所以试剂三加完需**立即**检测，若 A1 超过 1.2 或 ΔA 超过 0.35，则减少样本上样量，试剂二相应增加保持原体系不变（如样本上样量减为 10 μ L 时，试剂二增为 170 μ L），或减少反应时间 T（如减为 2min）。则改变后的 V1 和反应时间 T 需带入计算公式重新计算。

五、结果计算：

1、按样本鲜重计算：

酶活定义：每克组织每分钟内氧化 1 nmol NADH 定义为一个酶活单位。

$$\text{ctGPD}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T = 643.1 \times \Delta A \div W$$

2、按样本蛋白浓度计算：

酶活定义：每毫克组织蛋白每分钟内氧化 1 nmol NADH 定义为一个酶活单位。

$$\text{ctGPD}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T = 643.1 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

3、按细胞数量计算：

酶活定义：每 10⁴ 个细胞每分钟内氧化 1 nmol NADH 定义为一个酶活单位。

$$\text{ctGPD}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{cell}) = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 1.29 \times \Delta A$$

4、按液体体积计算：

酶活定义：每毫升液体每分钟内氧化 1 nmol NADH 定义为一个酶活单位。

$$\text{ctGPD}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}) = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V1 \div T = 643.1 \times \Delta A$$

V---加入提取液体积，1 mL；

V1---加入样本体积，0.02mL；

V2---反应体系总体积，2 \times 10⁴ L；

d---光径，0.5cm；

ϵ ---NADH 摩尔消光系数，6.22 \times 10³ L / mol / cm；

W---样本质量，g；

T---反应时间，5min；

Cpr---蛋白浓度（mg/mL），建议使用本公司的 BCA 蛋白含量测定试剂盒。