

## 3-磷酸甘油氧化酶（GPO）活性测定试剂盒说明书

（货号：ADS-F-T029 分光法 48 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 60mL×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 25mL×1 瓶	4℃保存	
试剂三	液体 11mL×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：

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）、可调式移液枪、离心机、研钵。

### 四、3-磷酸甘油氧化酶(GPO)含量测定：

#### 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 可见分光光度计预热 30min，调节波长到 510 nm，蒸馏水调零。

② 所有试剂解冻至 37℃或于 37℃水浴锅中水浴 5-10min。

③ 在 1mL 比色皿（光径 1cm）中依次加入：

试剂名称（μL）	测定管
样本	50
试剂一	20
试剂二	450
试剂三	200
混匀，立即于 510nm 处读取 A1，37℃孵育 30min 后读取 A2，ΔA=A2-A1。	

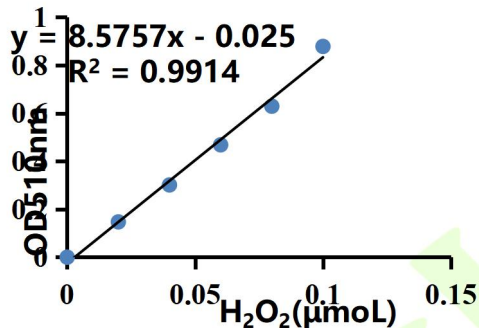
【注】1.若ΔA 较小，可以增加反应时间 T（如增至 1 小时），或增加样本量 V1（由 50μL 增至 150μL，则试剂二相应减少），则改变后的 T 和 V1 需重新代入公式计算。

2. ΔA 最好控制在标准曲线的线性范围内，若ΔA 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 V1（如减至 10μL，则试剂二相应增加），或减少反应时间 T（如减至 10min），则改变后

的 T、V1 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  $y = 8.5757x - 0.025$ ；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 1nmol 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 定义为一个酶活单位(U)。

$$\begin{aligned} \text{GPO 活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.025) \div 8.5757 \times 10^3] \div (W \times V1 \div V) \div T \times D \\ &= 77.7 \times (\Delta A + 0.025) \div W \times D \end{aligned}$$

3、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 1nmol 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 定义为一个酶活单位(U)。

$$\begin{aligned} \text{GPO 活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) &= [(\Delta A + 0.025) \div 8.5757 \times 10^3] \div (Cpr \times V1) \div T \times D \\ &= 77.7 \times (\Delta A + 0.025) \div Cpr \times D \end{aligned}$$

4、按细胞数量计算：

酶活定义：每 10<sup>4</sup> 个细胞每分钟分解底物生成 1nmol 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 定义为一个酶活单位(U)。

$$\begin{aligned} \text{GPO 活性}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A + 0.025) \div 8.5757 \times 10^3] \div (500 \times V1 \div V) \div T \times D \\ &= 77.7 \times (\Delta A + 0.025) \div 500 \times D \end{aligned}$$

5、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 1nmol 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 定义为一个酶活单位(U)。

$$\text{GPO 活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}) = [(\Delta A + 0.025) \div 8.5757 \times 10^3] \div V1 \div T \times D = 77.7 \times (\Delta A + 0.025) \times D$$

W---样品质量，g；

V---提取液体积，1 mL；

V1---上清液体积 (mL)，0.05mL；

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 250mM。
- 2 把母液稀释成以下浓度梯度的标准品：0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2mM。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 510nm 处测定；根据结果即可制作标准曲线。