

3-磷酸甘油醛脱氢酶(NADH-GAPDH)试剂盒说明书

(货号：ADS-W-T007 微板法 96 样)

一、产品简介：

3-磷酸甘油醛脱氢酶分为胞质型和质体型，细胞质中的3-磷酸甘油醛脱氢酶（EC 1.2.1.12）是糖酵解的中枢环节之一，特异的以NADH为辅酶，催化3-磷酸甘油醛形成1,3-二磷酸甘油酸的可逆反应，与糖异生途径及体内血糖浓度的维持、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。

本试剂盒耦联3-磷酸甘油酸激酶，以三磷酸甘油酸为底物，于340nm处测定NADH的下降速率来得出NADH-GAPDH酶活性的大小。

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	使用前甩几下或离心使试剂落入底部，再加 1.1mL 蒸馏水溶解备用。
试剂二	粉剂 3 支	-20℃保存	使用前甩几下或离心使试剂落入底部，每支加 0.4mL 蒸馏水溶解，用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融，三天内用完。
试剂三	液体 2 支	-20℃保存	使用前甩几下或离心使试剂落入底部，再加 0.6mL 蒸馏水溶解备用。可-20℃分装冻存。
试剂四	液体 16mL×1 瓶	4℃保存	
试剂五	粉剂 1 支	4℃保存	使用前甩几下或离心使试剂落入底部，再加 1.1mL 蒸馏水溶解备用。

三、所需的仪器和用品：

酶标仪、96孔板、可调式移液器、天平、震荡仪、低温离心机、研钵。

四、3-磷酸甘油醛脱氢酶(NADH-GAPDH)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：

称取约0.1g组织样本，加入1mL提取液，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/细胞样本：

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（冰浴，功率200W，超声3s，间隔10s，重复30次）；12000rpm，4℃离心10min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照细菌或细胞数量（10⁴个）：提取液体积（mL）为500~1000:1比例提取。

③ 液体样本（如血清）：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，调节波长至 340nm，设定温度 25°C。
- ② 所有试剂解冻至室温（25°C）。
- 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	10
试剂三	10
试剂四	140
混匀，室温（25°C）条件下，孵育 10min	
试剂五	10
轻轻混匀，室温（25°C）条件下，30s 时于 340nm 处读取吸光值 A1，10min 后再读取 A2， $\Delta A = A1 - A2$ 。	

- 【注】
1. 若 ΔA 的值在零附近，可以适当延长反应时间到 20min 后读取 A2，改变后的反应时间需代入计算公式重新计算。或适当加大样本量（如 40μL，则试剂四相应减少），则改变后的加样体积需代入计算公式重新计算。
 2. 若下降趋势不稳定，可以每隔 20S 读取一次吸光值，选取一段线性下降的时间段来参与计算，相对应的 A 值也代入计算公式重新计算。
 3. 若起始值 A1 太大如超过 2（如颜色较深的植物叶片，一般色素较高，则起始值相对会偏高），可以适当减少样本加样量，则改变后的加样体积需代入计算公式重新计算。或向待测样本中加少许活性炭混匀静置 5min 后 12000rpm, 4°C 离心 10min，上清液用于检测；
 4. 若 ΔA 的值大于 0.5，则需减少反应时间（如减少至 5min），或减少样本量（如 10μL），则改变后的反应时间 T 和样本量 V1 需代入计算公式重新计算。

五、结果计算：

1、按照样本蛋白浓度计算：

酶活定义：每毫克组织蛋白每分钟消耗 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NADH-GAPDH}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T = 321.6 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

2、按照样本质量计算：

酶活定义：每克组织每分消耗 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NADH-GAPDH}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T = 321.6 \times \Delta A \div W$$

3、按细菌或细胞密度计算：

酶活定义：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。

$$\text{NADH-GAPDH}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.643 \times \Delta A$$

4、按液体体积计算：

酶活定义：每毫升液体每分钟消耗 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NADH-GAPDH}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div V1 \div T = 321.6 \times \Delta A$$

ϵ ---NADH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3 \text{ L}/\text{mol}/\text{cm}$ ；

d---光径，0.5cm；

V---加入提取液体积，1mL；

V1---加入样本体积，0.02mL；

V2---反应体系总体积，0.2mL= 2×10^{-4} L；

T---反应时间，10min；

W---样本质量，g

500---细菌或细胞数量，万；

Cpr---样本蛋白质浓度，mg/mL；建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。