

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 有效期：3 个月）

一、指标介绍：

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_2O_2)， H_2O_2 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：

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 100mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	粉剂 1 支	-20℃避光保存	1. 临用前 8000g 4℃ 离心 2min 使试剂落入管底（可手动甩一甩）； 2. 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℃避光保存	
标准品	液体 1mL×1 支	4℃避光保存	1. 若重新做标曲，则用到该试剂； 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制； 3. 溶解后的标品一周内用完。

三、实验器材：

研钵（匀浆机）、冰盒（制冰机）、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅（烘箱、培养箱、金属浴）、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

四、指标测定：

建议先选取 1-3 个差异大的样本（例如不同类型或分组）进行预实验，熟悉操作流程，根据预实验结果确定或调整样本浓度，以防造成样本或试剂不必要的浪费！

1、样本提取：

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(10^4)：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、检测步骤：

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：

试剂组分 (μL)	测定管
样本	20

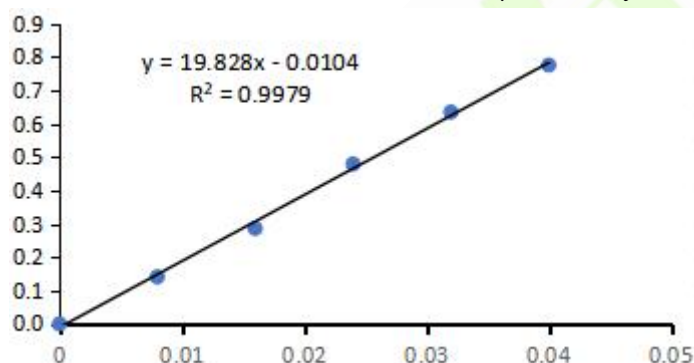
试剂一	10
试剂二	110
试剂三	60
混匀，立即于 510nm 处读取 A1，37°C 孵育 30min 后读取 A2， $\Delta A = A2 - A1$ 。	

【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 20 μ L 增至 50 μ L，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 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 V1（如减至 10 μ L，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 $y = 19.828x - 0.0104$ ；x 为标准品摩尔质量（ μ mol），y 为 ΔA 。



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_2O_2 定义为一个酶活单位(U)。

$$\begin{aligned} \text{GPO 活性(nmol/min/g 鲜重)} &= [(\Delta A + 0.0104) \div 19.828 \times 10^3] \div (W \times V1 \div V) \div T \times D \\ &= 84.1 \times (\Delta A + 0.0104) \div W \times D \end{aligned}$$

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_2O_2 定义为一个酶活单位(U)。

$$\begin{aligned} \text{GPO 活性(nmol/min/mg prot)} &= [(\Delta A + 0.0104) \div 19.828 \times 10^3] \div (Cpr \times V1) \div T \times D \\ &= 84.1 \times (\Delta A + 0.0104) \div Cpr \times D \end{aligned}$$

4、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 1nmol 的 H_2O_2 定义为一个酶活单位(U)。

$$\begin{aligned} \text{GPO 活性(nmol/min/10}^4 \text{ cell)} &= [(\Delta A + 0.0104) \div 19.828 \times 10^3] \div (500 \times V1 \div V) \div T \times D \\ &= 84.1 \times (\Delta A + 0.0104) \div 500 \times D \end{aligned}$$

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_2O_2 定义为一个酶活单位(U)。

$$\text{GPO 活性(nmol/min/mL)} = [(\Delta A + 0.0104) \div 19.828 \times 10^3] \div V1 \div T \times D = 84.1 \times (\Delta A + 0.0104) \times D$$

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 标准品母液浓度为 250mM，将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0，0.4，0.8，1.2，1.6，2 mM。也可根据实际样本调整标准品浓度。
- 2 标品稀释参照表如下：

1. 吸取标准品母液 40uL，加入 960uL 蒸馏水，混匀得到 10mM 的标品稀释液；						
2.再吸取 10mM 标品稀释液 200ul，加入 800ul 蒸馏水，混匀得到 2mM 的标品稀释液待用。						
标品浓度 mM	0	0.4	0.8	1.2	1.6	2
标品稀释液 uL	0	40	80	120	160	200
水 uL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

- 3 依据测定管加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。

试剂名称 (μL)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	20	
蒸馏水		20
试剂一	10	10
试剂二	110	110
试剂三	60	60
混匀，于 510nm 处读取各管吸光值， $\Delta A = A_{测定} - A_{0 浓度管}$		