

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 有效期：3 个月）

一、指标介绍：

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 3 支	-20℃保存	每支： 1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底； 2. 每支分别加 0.44mL 蒸馏水溶解备用； 3. 用不完的试剂-20℃保存，禁止反复冻融，三天内用完。
试剂二	液体 17mL×1 瓶	4℃保存	
试剂三	粉剂 1 支	4℃保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底； 2. 加 1.1mL 蒸馏水充分溶解； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。

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（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℃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℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

【注】：也可按照细菌或细胞数量（10⁴ 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、检测步骤：

- 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：

试剂组分 (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 10μL 时，试剂二增为 170μL），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。

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

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。

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

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。

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

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。

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

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，2×10⁻⁴ L；

d---光径，0.5cm；

ε---NADH 摩尔消光系数，6.22×10³ 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。