

叶绿体 3-磷酸甘油醛脱氢酶(NADPH-GAPDH)试剂盒说明书

(货号: ADS-F-T007-48 分光法 48 样 有效期: 3 个月)

一、指标介绍:

3-磷酸甘油醛脱氢酶分为胞质型和质体型, 植物叶绿体中的 3-磷酸甘油醛脱氢酶 (EC 1.2.1.13) 属于是质体型, 多以 NADPH 为辅酶, 催化糖酵解的逆反应, 将 1,3 二磷酸甘油酸还原为 3 磷酸甘油醛, 该酶在同化 CO₂ 的卡尔文循环中起中心作用。利用 GAPDH 逆向催化 1,3 二磷酸甘油酸和 NADPH 生成 3 磷酸甘油醛和 NADP⁺, 于 340nm 处测定 NADPH 的下降速率即可得出叶绿体中 NADPH-GAPDH 酶活性的高低。

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
提取液一	液体 50mL×1 瓶	4℃保存	
提取液二	液体 50mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉剂 1 支	-20℃避光保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底; 2. 加入 1.1mL 蒸馏水溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂二	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. 加入 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 1 支	-20℃保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底; 2. 加 1.1mL 蒸馏水溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂四	液体 30mL×1 瓶	4℃保存	
试剂五	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. 加入 1.1mL 蒸馏水溶解备用; 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)、1ml 石英比色皿、离心管、紫外分光光度计、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:

称取约 0.2g 样本, 加入 1mL 提取液一, 快速冰浴匀浆后于 4℃, 1600rpm 离心 5min, 弃沉淀, 取上清再

4℃, 5000rpm离心15min, 弃上清留沉淀, 向沉淀中加1mL提取液二, 强力涡旋震荡15s, 置于冰上(或冰箱)孵育15min, 在4℃, 13000rpm离心5min, 取上清测定叶绿体中3-磷酸甘油醛脱氢酶(NADPH-GAPDH)的酶活性。提示: 整个叶绿体的提取过程须保持4℃低温环境。

【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 液体样品: 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 紫外分光光度计预热 30min, 调节波长至 340nm, 设定温度 25℃, 蒸馏水调零。

② 所有试剂解冻至室温 (25℃) 。

③ 在 1mL 石英比色皿 (光径 1cm) 中依次加入:

试剂组分 (μL)	测定管
样本	60
试剂一	20
试剂二	20
试剂三	20
试剂四	580
混匀, 室温 (25℃) 条件下, 孵育 10min	
试剂五	20
轻轻混匀, 室温 (25℃) 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 100μL, 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℃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 40μL), 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 NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NADPH-GAPDH}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (V1 \times Cpr) \div T = 193 \times \Delta A \div Cpr$$

2、按照样本质量计算:

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

$$\text{NADPH-GAPDH}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T = 193 \times \Delta A \div W$$

3、按照液体体积计算:

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

$$\text{NADPH-GAPDH}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div V1 \div T = 193 \times \Delta A$$

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

V---加入提取液体积, 1mL;

V2---反应体系总体积, $0.72 \text{ mL} = 7.2 \times 10^{-4} \text{ L}$;

W---样本质量, g

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。

d---比色皿光径, 1cm;

V1---加入样本体积, 0.06mL;

T---反应时间, 10min;