

## 3-磷酸甘油醛脱氢酶(NADH-GAPDH)试剂盒说明书

(货号: ADS-F-T007-25 分光法 24 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, 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:

| 试剂组分 | 试剂规格        | 存放温度     | 注意事项                                                                                            |
|------|-------------|----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 提取液  | 液体 30mL×1 瓶 | 4℃避光保存   |                                                                                                 |
| 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;<br>2. 加入 0.6mL 蒸馏水溶解备用;<br>3. 保存周期与试剂盒有效期相同。                 |
| 试剂二  | 粉剂 2 支      | -20℃保存   | 每支:<br>1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底;<br>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;<br>2. 加入 0.6mL 蒸馏水溶解备用。可-20℃分装冻存。                            |
| 试剂四  | 液体 18mL×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;<br>2. 加入 0.6mL 蒸馏水溶解备用;<br>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 0.1g 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（ $10^4$  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、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，<br>$\Delta A = A1 - A2$ 。 |     |

【注】1. 若  $\Delta A$  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  $\Delta A$  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 20μL），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。

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

### 2、按照样本质量计算：

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

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

### 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。

$$\text{NADH-GAPDH}(\text{nmol/min}/10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.39 \times \Delta A$$

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。

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

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

$d$ ---比色皿光径,  $1\text{cm}$ ;

$V$ ---加入提取液体积,  $1\text{mL}$ ;

$V1$ ---加入样本体积,  $0.06\text{mL}$ ;

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

$T$ ---反应时间,  $10\text{min}$ ;

$W$ ---样本质量,  $\text{g}$

$500$ ---细菌或细胞数量, 万;

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