

3-磷酸甘油醛脱氢酶(Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)试剂盒说明书

分光光度法 25 管/24 样

注 意：正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义：

GAPDH 催化 3-磷酸甘油醛氧化生成 1,3-二磷酸甘油酸，是糖酵解途径的关键酶，与糖异生途径、体内血糖浓度的维持和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。

测定原理：

3-磷酸甘油酸激酶催化三磷酸甘油酸和 ATP 生成 1,3 二磷酸甘油酸。GAPDH 逆向催化 1,3 二磷酸甘油酸和 NADH 生成 3 磷酸甘油醛、无机磷和 NAD，340nm 处测定 NADH 的减少量可反映 GAPDH 活性的高低。

需自备的仪器和用品：

分光光度计、恒温水浴锅、台式离心机、可调式移液器、1 mL 石英比色皿、研钵、冰和蒸馏水。

试剂的组成和配制：

提取液一：液体 25mL×1 瓶，4℃ 保存。

提取液二：液体 25mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂一：粉剂×1 瓶，-20℃ 保存；

试剂二：液体 25mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂三：液体 14 μL×1 支，4℃ 保存；

组织样本的前处理：

①总 GAPDH 酶提取：建议称取约 0.1g 样本，加入 1mL 提取液一，冰浴匀浆后超声破碎（冰浴，200W，破碎 3s，间歇 7s，总时间 1min），然后 4℃，8000g 离心 10min，取上清测定。

②胞浆和叶绿体 GAPDH 酶的分离：按照植物组织质量（g）：提取液体积（mL）为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 样本，加入 1mL 提取液一），冰浴匀浆后于 4℃，200g 离心 5min，弃沉淀，取上清在 4℃，8000g 离心 10min，取上清用于测定胞浆 GAPDH 酶活性，取沉淀加 1mL 提取液二，震荡溶解后超声破碎（冰浴，200W，破碎 3s，间歇 7s，总时间 1min），然后 4℃，8000g 离心 10min，取上清测定叶绿体中 GAPDH 酶活性。

建议测定总 GAPDH 酶活性，按照步骤①提取粗酶液，若需要分别测定胞浆和叶绿体中的 GAPDH，则按照步骤②提取粗酶液。

细菌或培养细胞的前处理：

先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；按照细菌或细胞数量（10⁴ 个）：提取液一（mL）为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液一），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）；8000g 4℃ 离心 10min，取上清，置冰上待测。

测定步骤：

1、分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 340nm，蒸馏水调零。

2、样本测定

(1) 工作液的配制：将试剂二全部倒入试剂一瓶中，充分溶解，37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其它物种) 预热 10 分钟；用不完的试剂分装后-20℃ 保存，禁止反复冻融。

(2) 在试剂三中加入 500 μL 蒸馏水，充分混匀待用；用不完的试剂分装后-20℃ 保存，禁止反复冻融。

(3) 在 1mL 石英比色皿中加入 30 μL 样本、20 μL 试剂三和 950 μL 工作液，混匀，加入最后一个试剂的同时开始计时，记录 340nm 处 20s 时的吸光值 A1 和 5min20s 后的吸光值 A2，计算 $\Delta A = A1 - A2$ 。

GAPDH 活性计算：

(1) 按样本蛋白浓度计算

单位的定义：每 mg 组织蛋白每分钟消耗 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{GAPDH (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 1072 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

(2) 按样本鲜重计算

单位的定义：每 g 组织每分钟消耗 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{GAPDH (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1072 \times \Delta A \div W$$

(3) 按细菌或细胞密度计算

单位的定义：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。

$$\text{GAPDH (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 2.144 \times \Delta A$$

V 反总：反应体系总体积，1×10⁻³ L；ε：NADH 摩尔消光系数，6.22×10³ L / mol /cm；d：比色皿光径，1cm；V 样：加入样本体积，0.03 mL；V 样总：加入提取液体积，1 mL；T：反应时间，5 min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；500：细菌或细胞总数，500 万。