

3-磷酸甘油醛脱氢酶（GAPDH）活性检测试剂盒说明书

微量法

货号: BC2215

规格: 100T/96S

产品组成: 使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致, 有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 100 mL×1 瓶	2-8℃ 保存
试剂一	粉剂×1 瓶	-20℃ 保存
试剂二	液体 20 mL×1 瓶	2-8℃ 保存
试剂三	液体 12 μL×1 瓶	2-8℃ 保存

溶液的配制:

- 1、试剂三: 液体置于试剂瓶内 EP 管中, 使用前先将液体离心至底部 (使用掌上离心机即可)。根据用量按照试剂三: 蒸馏水为 3:100 的体积比例充分混匀, 现用现配;
- 2、工作液的配制: 将试剂二全部倒入试剂一瓶中, 充分溶解, 根据需要取一定的量 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其它物种) 预热 10min; 用不完的试剂分装后 -20℃ 保存, 禁止反复冻融。

产品说明:

GAPDH (EC1.2.1.12) 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。

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。

注意: 实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。

需自备的仪器和用品:

紫外分光光度计/酶标仪、低温离心机、水浴锅、微量石英比色皿/96 孔 UV 板、可调式移液枪、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水。

操作步骤:

一、样本处理 (可适当调整待测样本量, 具体比例可以参考文献)

组织: 按照组织质量 (g): 提取液体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液) 进行冰浴匀浆, 然后, 8000g, 4℃, 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

细菌或培养细胞: 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): 提取液体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 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 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次); 8000g 4℃ 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

血清 (浆): 直接检测。

二、测定步骤:

- 1、分光光度计/酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 340nm, 分光光度计蒸馏水调零。
- 2、操作表 (在微量石英比色皿或 96 孔 UV 板中分别加入下列试剂):





试剂名称	空白管	测定管
样本 (μL)		6
蒸馏水 (μL)	6	
试剂三 (μL)	4	4
工作液 (μL)	190	190

在微量石英比色皿/96 孔 UV 板中分别加入上述试剂，充分混匀后于 340nm 处测定 10s 时的吸光值 A1，迅速置于 37℃（哺乳动物）或 25℃（其他物种）水浴或培养箱 5min（酶标仪有控温功能可将温度调至 37℃或 25℃），拿出迅速擦干测定 5min10s 时的吸光值 A2，计算ΔA 测定管=A1 测定-A2 测定，ΔA 空白管=A1 空白-A2 空白，ΔA=ΔA 测定管-ΔA 空白管。（空白管只需做 1-2 次）

三、GAPDH 酶活计算：

A、按微量石英比色皿计算：

(1) 按蛋白浓度计算

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

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

(2) 按样本质量计算

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

$$\text{GAPDH 酶活 (U/g 质量)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times W \div V_{\text{样总}}) \div T = 1072 \times \Delta A \div W$$

(3) 按照细菌或细胞数量计算

酶活定义：每 10⁴ 个细菌或细胞每分钟消耗 1nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{GAPDH 酶活 (U/10}^4 \text{ cell)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_{\text{反总}} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 2.14 \times \Delta A$$

(4) 按液体体积计算

酶活定义：每 mL 样本每分钟消耗 1nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{GAPDH 酶活 (U/mL)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T = 1072 \times \Delta A$$

ε: NADH 摩尔消光系数, 6.22×10³L/ mol /cm; d: 微量石英比色皿光径, 1cm; V 反总: 反应体系总体积, 0.0002L; V 样: 反应体系中样本体积, 0.006mL; V 样总: 加入提取液体积, 1mL; Cpr: 样本蛋白浓度, mg/mL, 蛋白浓度需自行测定; W: 样本质量, g; T: 反应时间: 5min; 500: 细菌或细胞总数, 500 万; 10⁹: 单位换算系数, 1mol=10⁹nmol。

B、按 96 孔 UV 板计算：

将上述公式中的 d-1cm 改为 d-0.6cm（96 孔 UV 板光径）进行计算即可。

注意事项：

- 1、当 A1 小于 0.8 或 ΔA 大于 0.7 时（96 孔 UV 板为 A1 小于 0.4 或 ΔA 大于 0.4），建议将样本稀释后再进行测定。
- 2、空白管为检测各试剂组分质量的检测孔，正常情况下，变化不超过 0.02。

实验实例：

1. 取 0.1g 兔肾脏加入 1mL 提取液，进行冰浴匀浆，然后 8000g，4℃，离心 20min，取上清置冰上，之后按照测定步骤操作，用微量石英比色皿测得计算 ΔA 测定管=A1 测定-A2 测定=0.9333-0.2289=0.7044，ΔA 空白管=A1 空白-A2 空白=0.9322-0.9274=0.0048，ΔA=ΔA 测定管-ΔA 空白管=0.6996，按样本质量计算酶活得：
GAPDH 酶活 (U/g 质量) = 1072 × ΔA ÷ W = 7499.7 U/g 质量。
2. 取 0.1g 三叶草加入 1mL 提取液，进行冰浴匀浆，然后 8000g，4℃，离心 20min，取上清置冰上，之后按照测定步骤操作，用微量石英比色皿测得计算 ΔA 测定管=A1 测定-A2 测定=1.0184-1.0042=0.0142，ΔA 空白管=A1 空白-A2 空白=0.9322-0.9274=0.0048，ΔA=ΔA 测定管-ΔA 空白管=0.0094，按样本质量计算酶活得：



GAPDH 酶活 (U/g 质量) = $1072 \times \Delta A \div W = 100.77$ U/g 质量。

3. 取兔血清直接检测, 用微量石英比色皿测得计算 ΔA 测定管 = A1 测定 - A2 测定 = $0.9528 - 0.9303 = 0.0225$, ΔA 空白管 = A1 空白 - A2 空白 = $0.9322 - 0.9274 = 0.0048$, $\Delta A = \Delta A$ 测定管 - ΔA 空白管 = 0.0177 , 按血清 (浆) 体积计算酶活得:
GAPDH 酶活 (U/mL) = $1072 \times \Delta A = 18.974$ U/mL。

相关发表文献:

- [1] Qu H, Zong Q, Hu P, Li Z, Wang H, Wu S, Liu HY, Bao W, Cai D. Desmosterol: A natural product derived from macroalgae modulates inflammatory response and oxidative stress pathways in intestinal epithelial cells. *Front Immunol*. 2023 Jan 4; 13:1101643. doi: 10.3389/fimmu.2022.1101643. PMID: 36685553; PMCID: PMC9845693.
- [2] Li Y, Jin L, Li Y, Qian J, Wang Z, Zheng X, Xie C, Zhang X, Huang H, Zhou Y. Lysophosphatidic Acid Improves Human Sperm Motility by Enhancing Glycolysis and Activating L-Type Calcium Channels. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022 Jul 12; 13:896558. doi: 10.3389/fendo.2022.896558. PMID: 35903269; PMCID: PMC9317953.
- [3] Liang Q, Dong B, Li A, Wu L, Zhang Y, Han T, Liu X. scRNA-seq analysis reveals toxicity mechanisms in shrimp hemocytes subjected to nitrite stress. *Chemosphere*. 2023 Mar; 316:137853. doi: 10.1016/j.chemosphere.2023.137853. Epub 2023 Jan 11. PMID: 36640974.
- [4] Pei J, Yuan Y, Tian D, Huang F, Zhang C, Wang C, Zhou M, Chen H, Fu Z, Zhao L. Comprehensive Analysis of Protein Acetylation and Glucose Metabolism in Mouse Brains Infected with Rabies Virus. *J Virol*. 2022 Feb 23;96(4):e0194221. doi: 10.1128/JVI.01942-21. Epub 2021 Dec 8. PMID: 34878915; PMCID: PMC8865465.

相关系列产品:

- BC0990/BC0995 植物叶绿素含量检测试剂盒
BC4330/BC4335 植物类胡萝卜素含量检测试剂盒

