

3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)检测试剂盒（定磷法/微量法）

货号：PMK1926

保存：-20℃避光保存 12 个月

规格：48T/96T

适用样本：动植物组织、细胞、细菌

产品简介

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。本试剂盒提供了一种简单的检测方法，用于检测生物样本中 GAPDH 活性。其原理是 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、NAD 和无机磷，通过测定无机磷增加速率来测定 GAPDH 活性。

产品内容

试剂盒组分	规格		储存条件
	48T	96T	
提取液	50mL	100mL	4℃，保存
试剂一	粉剂×1 瓶	粉剂×1 瓶	-20℃，避光保存
试剂二	10mL	20mL	4℃，保存
试剂三	60μL	120μL	-20℃，避光保存
试剂四	粉剂×1 瓶	粉剂×1 瓶	4℃避光保存
试剂五	粉剂×1 瓶	粉剂×1 瓶	4℃避光保存
试剂六	粉剂×1 瓶	粉剂×1 瓶	4℃避光保存
试剂七	5mL	10mL	室温保存
标准品	1mL	1mL	4℃避光保存

自备耗材

酶标仪或分光光度计（能测 660nm 处的吸光度）及恒温箱
96 孔板或微量玻璃比色皿、可调节式移液枪及枪头
制冰机、低温离心机
去离子水
匀浆器（如果是组织样本）

试剂准备

注意：各组分（小管试剂）开盖前，请先低速离心。

提取液：即用型；使用前，平衡到室温；4℃保存。

工作液的配制：将试剂二全部倒入试剂一瓶中，充分溶解；用不完的试剂分装后-20℃保存，避免反复冻融。

试剂三：使用时，用去离子水进行 1:10 稀释，整个实验过程中，冰上避光放置。现用现配，用多少配多少；-20℃保存。

产品说明书

试剂四：临用前配制，48T 加入 2mL 去离子水充分溶解，96T 加入 4mL 去离子水充分溶解后使用。

试剂五：临用前配制，48 T 加入 5mL 去离子水充分溶解，96T 加入 10mL 去离子水充分溶解后使用。

试剂六：临用前配制，48 T 加入 5mL 去离子水充分溶解，96 T 加入 10mL 去离子水充分溶解后使用。

试剂七：即用型；室温保存。

定磷试剂的配制：配制比例按照 H_2O : 试剂七 : 试剂八 : 试剂九=2:1:1:1 的比例配制，配好的定磷试剂应为浅黄色。若无色则试剂失效，若是蓝色则为磷污染（请根据需要，用多少配多少）。

注意：配试剂最好用新的玻璃器皿或者一次性塑料器皿，以避免磷污染。

标准曲线设置：按下表所示用去离子水将 10mM 标准品稀释为 1、0.5、0.25、0.125、0.0625、0.0313、0.0156 mM 的标准溶液。

	标准品体积 (μL)	去离子水体积 (μL)	标准品浓度 (mM)
Std. 1	100μL 10mM	900	1
Std. 2	100μL of Std. 1 (1mM)	100	0.5
Std. 3	100μL of Std. 2 (0.5mM)	100	0.25
Std. 4	100μL of Std. 3 (0.25mM)	100	0.125
Std. 5	100μL of Std. 4 (0.125mM)	100	0.0625
Std. 6	100μL of Std. 5 (0.0625mM)	100	0.0313
Std. 7	100μL of Std. 6 (0.0313mM)	100	0.0156

样本制备

组织：称取约 0.1g 样本，加入 1mL 提取液，冰浴匀浆后超声波破碎 5min（功率 20%或 200W，超声 3s，间隔 7s，重复 30 次），然后 8,000g，4℃离心 10min，取上清液置冰上待测。

细胞或细菌：收集 500 万细胞或细菌到离心管内，用冷 PBS 清洗细胞，离心后弃上清，加入 1mL 提取液，冰浴超声波破碎细胞或细菌 5min（功率 20%或 200W，超声 3s，间隔 7s，重复 30 次），然后 8,000g，4℃离心 10min，取上清液，置冰上待测。

注意：推荐使用新鲜样本，如果不立即进行实验，样本可在-80℃保存 1 个月。如需测定蛋白浓度，推荐使用 Bradford 法蛋白质定量试剂盒进行样本蛋白质浓度测定。

实验步骤

1. 样本测定：在 96 孔 UV 板或微量石英比色皿中依次加入 10μL 样本、180μL 工作液和 10μL 试剂三充分混匀，记录 340nm 处 20s 的吸光值 A_1 和 5min20s 的吸光值 A_2 ，计算 $\Delta A = A_1 - A_2$ 。

1. 酶标仪或可见分光光度计预热 30min 以上，调节波长到 660nm，可见分光光度计去离子水调零。

2. 工作液 37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）预热 10min。

3. 酶促反应（在 EP 管中依次加入下列试剂）：

	空白管 (μL)	标准管 (μL)	测定管 (μL)	对照管 (μL)
工作液	0	0	180	190
样本	0	0	10	0
试剂三	0	0	10	0

混匀后盖紧，37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）准确孵育 10min

试剂四	0	0	20	20
样本	0	0	0	10

混匀后，室温（25℃左右），4,000g，离心10min，取上清液；

4. 定磷(在 96 孔板或微量玻璃比色皿中加入下列试剂)

上清	0	0	40	40
不同浓度标准品	0	40	0	0
去离子水	40	0	0	0
定磷试剂	200	200	200	200

混匀，室温静置 10min 后，测定 660nm 吸光值。计算 $\Delta A_{\text{测}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ ， $\Delta A_{\text{标}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$ 。（空白和标准曲线只需做 1 次）

5. 注意：为保证实验结果的准确性，需先取 1-2 个样做预实验，如果测定的吸光值过高（高于 1.5）可用试剂二稀释样本后再测定，计算结果时注意乘以稀释倍数。

结果计算

1. 标准曲线的绘制

以标准液浓度为 y 轴， $\Delta A_{\text{标}}$ 为 x 轴，绘制标准曲线（浓度为 y 轴更方便计算结果）。

2. 无机磷（Pi）含量的计算

将 $\Delta A_{\text{测}}$ 带入方程得到 y 值（mM）。

3. GAPDH 活性计算

（1）按样本鲜重计算

单位的定义：每 g 组织在反应体系中每分钟产生 1nmol 无机磷定义为一个酶活性单位

$$\text{GAPDH 活性 (U/g 鲜重)} = (y \times V_{\text{酶促}} \times 10^6) \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T = 2000 \times y \div W$$

（2）按细胞或细菌数量计算

单位的定义：每 1 万个细胞或细菌在反应体系中每分钟产生 1nmol 无机磷定义为一个酶活性单位

$$\text{GAPDH 活性 (U/10}^4 \text{ cell)} = (y \times V_{\text{酶促}} \times 10^6) \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times 500) \div T = 4 \times y$$

（3）按样本蛋白浓度计算

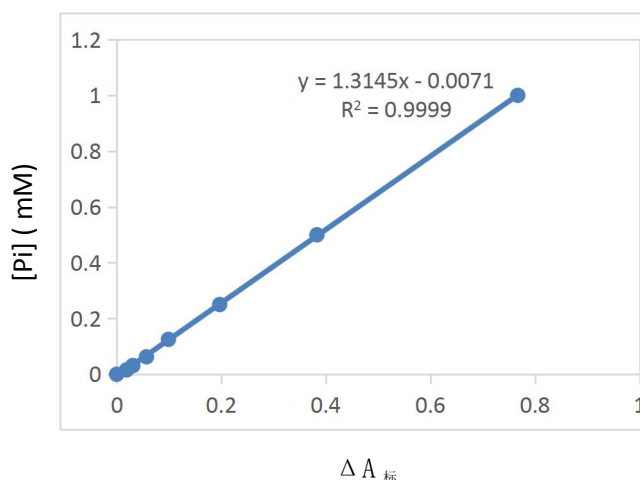
单位的定义：每 mg 组织蛋白在反应体系中每分钟产生 1nmol 无机磷定义为一个酶活性单位

$$\text{GAPDH 活性 (U/mg prot)} = (y \times V_{\text{酶促}} \times 10^6) \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T = 2000 \times y \div C_{\text{pr}}$$

$V_{\text{酶促}}$ ：酶促反应体系总体积， 2×10^{-4} L； 10^6 ：单位换算系数， $1\text{mmol}=10^6\text{nmol}$ ； $V_{\text{样}}$ ：加入样本体积，0.02mL； $V_{\text{样总}}$ ：加入提取液体积，1mL；T：反应时间，10min；W：样本重量，g；500：细胞总数，500 万；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL。

结果展示

典型标准曲线-以下数据和曲线仅供参考，实验者需根据自己的实验建立标准曲线。



产品说明书

注意事项

1. 实验过程中请穿戴实验服、口罩和乳胶手套。请按照生物实验室的国家安全规定进行实验，尤其是在检测血样或其他体液时。
2. 本试剂盒仅用于实验室科学研究，如果本试剂盒用于临床诊断或任何其他用途，我们将不对任何后果负责。
3. 本试剂盒应在有效期内使用，并请严格按照说明书进行存储。
4. 不同批次号、不同厂家之间的组分不要混用；否则，可能导致结果异常。
5. 勤换吸头，避免各组分之间的交叉污染。

相关产品：

PMK1120 己糖激酶（HK）检测试剂盒（微量法）

PMK1121 丙酮酸激酶（PK）检测试剂盒（微量法）

PMK1122 磷酸果糖激酶（PFK）/6-磷酸果糖激酶/果糖-6-磷酸激酶检测试剂盒（微量法）

更多产品详情了解，请关注公众号：

