Chloroplast glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase Assay Kit

叶绿体 3-磷酸甘油醛脱氢酶(NADPH-GAPDH)试剂盒说明书

货号:BN72645| 方法：紫外分光法 | 规格：24 样

一、产品简介：

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 CO_2 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：

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液一	液体 30mL×1 瓶	4℃保存	
提取液二	液体 30mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉剂 mg×1 支	4℃保存	用前甩几下或离心使试剂落入底部，再加 0.6mL 蒸馏水溶解备用。
试剂二	粉剂 mg×2 支	-20℃保存	用前甩几下或离心使试剂落入底部，每支加 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μL×1 支	-20℃保存	用前甩几下或离心使试剂落入底部，再加 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	液体 0.6mL×1 支	4℃保存	

三、所需的仪器和用品：

紫外分光光度计、1mL 石英比色皿（光径 1cm）、可调式移液器、天平、震荡仪、水浴锅、低温离心机、研钵。

四、叶绿体 3-磷酸甘油醛脱氢酶(NADPH-GAPDH)活性测定：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

1、样本制备：

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、上机检测：

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℃），或可放在 25℃条件下水浴 5-15min。

③ 试剂一和二和三和四可按照 20:20:20:580 比例配成混合液（一枪加 640μL 该混合液）（**该混合液用多少配多少，现配现用**）。

④ 在 1mL 石英比色皿（光径 1cm）中依次加入：

试剂名称（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，ΔA=A1-A2。	

注意：本操作流程适用于绝大多数常规样本检测，实验条件可根据实际样本状态适度微调；针对特殊类型样本，我司技术支持可提供专属优化建议。

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。

NADPH-GAPDH(nmol/min/mg prot)=[ΔA÷(ε×d)×V2×10^9]÷(V1×Cpr) ÷T=193×ΔA÷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。

NADPH-GAPDH(nmol/min/g 鲜重)=[ΔA÷(ε×d)×V2×10^9]÷(W×V1÷V) ÷T=193×ΔA÷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。

NADPH-GAPDH(nmol/min/mL)=[ΔA÷(ε×d)×V2×10^9]÷V1÷T=193×ΔA

ε---NADPH 摩尔消光系数，6.22×10^3 L / mol /cm；　　d---比色皿光径，1cm；

V---加入提取液体积，1mL；　　V1---加入样本体积，0.06mL；

V2---反应体系总体积，0.72mL=7.2×10^{-4}L；　　T---反应时间，10min；

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。