

(本试剂盒仅供体外研究使用, 不用于临床诊断!)

产品货号: E-BC-K790-M

产品规格: 48T(32 samples)/96T(80 samples)

检测仪器: 酶标仪(430-470 nm)

Elabscience®甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)

比色法测试盒

Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH)

Activity Assay Kit

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题, 请通过以下方式联系我们:

电话: 400-999-2100

邮箱: biochemical@elabscience.cn

网址: www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。

联系时请提供产品批号(见试剂盒标签), 以便我们更高效地为您服务。

用途

本试剂盒适用于检测组织和细胞样本中的甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)的活力。

检测原理

甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase, GAPDH) 作为糖酵解途径的关键酶, 催化 3-磷酸甘油醛氧化生成 1,3-二磷酸甘油酸。这一反应与糖异生途径、体内血糖浓度的维持和糖尿病的发生密切相关。GAPDH 的基因为管家基因, 几乎在所有组织中都高水平表达, 因此 GAPDH 广泛存在于组织细胞中, 在机体糖、脂、蛋白代谢紊乱疾病中发挥重要作用。

本试剂盒通过测定 GAPDH 催化 3-磷酸甘油醛氧化生成的产物单位时间内在 450 nm 处的 OD 值变化, 即可计算 GAPDH 的酶活。

本试剂盒检测组织和细胞样本时, 需测定总蛋白浓度, 动物组织样本和细胞样本推荐使用 BCA 法 (货号: E-BC-K318-M); 植物组织样本推荐使用考马斯亮蓝法 (货号: E-BC-K168-M)。

提供试剂和物品

编号	名称	规格 1 (Size 1)(48 T)	规格 2 (Size 2)(96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	缓冲液 (Buffer Solution)	10 mL×1 瓶	20 mL×1 瓶	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	底物 (Substrate)	液体×2 支	液体×4 支	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	显色剂 (Chromogenic Solution)	1.5 mL×1 支	3 mL×1 瓶	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	标准品 (Standard)	粉剂×2 支	粉剂×2 支	-20°C 避光 保存 6 个月
	96 孔酶标板	1 板		
	96 孔覆膜	2 张		
	样本位置标记表	1 张		

说明：试剂严格按上表中的保存条件保存，不同测试盒中的试剂不能混用。

对于体积较少的试剂，使用前请先离心，以免量取不到足够量的试剂。

所需自备物品

仪器：酶标仪(波长 430-470 nm，最佳检测波长 450 nm)、37 °C 恒温培养箱

试剂：生理盐水(0.9% NaCl)

试剂准备

① 检测前，试剂盒中的试剂平衡至室温。

② 工作液的配制：

取一支试剂二，加入2 mL试剂一混匀，全部移入5 mL EP管中，再加入1 mL试剂一稀释混匀，工作液现配现用。

③ 1 mmol/L标准品的配制：

取一支试剂四，用2 mL双蒸水溶解混匀，全部移入10 mL EP管中，再加入3 mL双蒸水稀释混匀，得到1 mmol/L标准品溶液，未使用完的试剂-20 °C避光可保存2周。

④ 500 μmol/L标准品的配制

按1 mmol/L标准品溶液：双蒸水=1: 1体积比配制，未使用完的试剂-20 °C避光可保存3天。

⑤ 不同浓度标准品的稀释：

编号	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
标准品浓度(μmol/L)	0	100	200	250	300	350	400	500
500 μmol/L 标准品(μL)	0	40	80	100	120	140	160	200
双蒸水(μL)	200	160	120	100	80	60	40	0

样本准备

① 样本处理

组织样本：按照组织样本质量(g)：生理盐水(0.9% NaCl)体积(mL) = 1:9 的比例匀浆，4℃，10000 × g离心10 min，取上清液，置于冰上待测，当天检测有效。留取部分上清，进行蛋白浓度测定。

细胞样本：取 1×10^6 个细胞，加入200 μL生理盐水(0.9% NaCl)匀浆，4℃，10000 × g离心10 min，取上清液，置于冰上待测，当天检测有效。留取部分上清，进行蛋白浓度测定。

② 样本的稀释

在正式检测前，需选择2-3个预期差异大的样本稀释成不同浓度进行预实验，根据预实验的结果，结合本试剂盒的线性范围：0.49-50.00 U/L，请参考下表稀释(仅供参考)：

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
10%小鼠肝脏组织	不稀释	10%小鼠肾组织	不稀释
10%小鼠肺组织	不稀释	10%菠菜组织	不稀释
10%西葫芦组织	不稀释	10%包菜组织	不稀释
1×10^6 个 HL-60 细胞	不稀释	1×10^6 个 CHO 细胞	不稀释

注：稀释液为生理盐水(0.9% NaCl)。

操作步骤

- ① 标准孔: 取 40 μL 不同浓度的标准品溶液, 分别加入相应的酶标孔中。
测定孔: 取 40 μL 待测样本加入相应的酶标孔中。
- ② 向步骤①中各孔加入 100 μL 工作液。
- ③ 向步骤②中各孔加入 20 μL 试剂三。
- ④ 振板 5 s, 立即使用酶标仪于 450 nm 检测各孔的 OD 值 A_1 。
- ⑤ 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 10 min, 使用酶标仪于 450 nm 检测各孔的 OD 值 A_2 , 标准曲线以标准孔 A_2 值进行拟合。

操作表

	标准孔	测定孔
不同浓度标准品溶液(μL)	40	--
待测样本(μL)	--	40
工作液(μL)	100	100
试剂三(μL)	20	20
振板 5 s, 立即使用酶标仪于 450 nm 测定各孔的 OD 值 A_1 。		
37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 10 min, 使用酶标仪于 450 nm 测定各孔的 OD 值 A_2 , 标准曲线以标准孔 A_2 值进行拟合。		

本试剂盒检测组织和细胞样本时, 需测定总蛋白浓度, 动物组织样本和细胞样本推荐使用 BCA 法 (货号: E-BC-K318-M); 植物组织样本推荐使用考马斯亮蓝法 (货号: E-BC-K168-M)。

结果计算

标准品拟合曲线: $y = ax + b$

组织和细胞样本中甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)酶活计算公式:

定义:37℃条件下,每克组织或细胞蛋白在反应体系中每分钟生成1 μmol产物定义为一个酶活力单位。

$$\text{GAPDH 活力} = (\Delta A - b) \div a \div C_{\text{pr}} \times f \div T$$

(U/gprot)

注解:

y: 标准品 OD 值-空白 OD 值(标准品浓度为 0 时的 OD 值, 标准曲线以标准孔 A₂ 值进行拟合)

x: 标准品的浓度

a: 标曲的斜率

b: 标曲的截距

ΔA: 样本的绝对 OD 值, ΔA = A₂ - A₁

C_{pr}: 匀浆后样本蛋白浓度, gprot/L

f: 样本加入检测体系前的稀释倍数

T: 反应时间, 10 min

附录1 关键数据

1. 技术参数

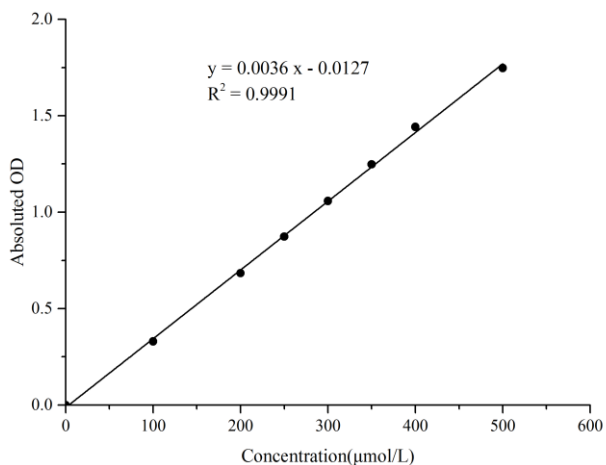
检测范围	0.49-50.00 U/L	批间差	3.2-8.6%
灵敏度	0.49 U/L	批内差	3.2-5.0%
稀释回收率	95-101%		

2. 标准曲线(数据仅供参考)

①不同浓度标准品加样量40 μL, 按照操作步骤进行实验, OD值如下表所示:

标准品浓度 (μmol/L)	0	100	200	250	300	350	400	500
OD 值	0.05	0.378	0.737	0.922	1.1	1.298	1.498	1.811
	0.05	0.382	0.731	0.924	1.117	1.298	1.486	1.784
平均 OD 值	0.05	0.38	0.734	0.923	1.109	1.298	1.492	1.798
绝对 OD 值	0	0.33	0.684	0.873	1.059	1.248	1.442	1.748

② 绘制标曲(如下图):



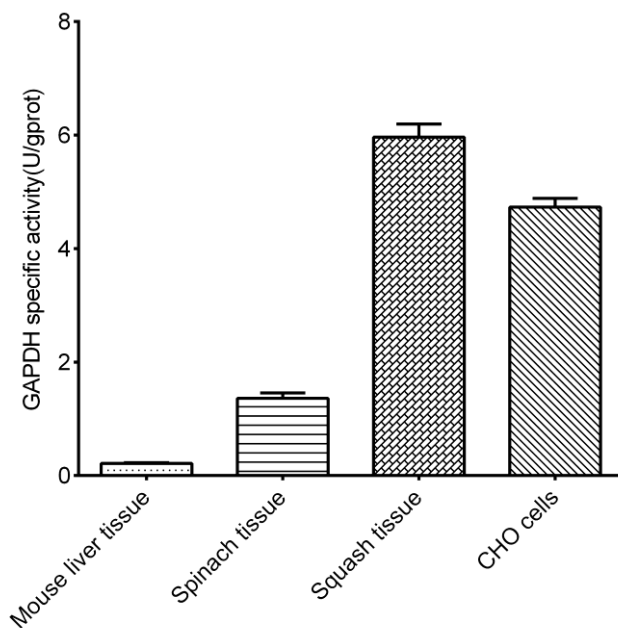
附录2 实例分析

例如检测小鼠肝组织(数据仅供参考):

取40 μL 10%小鼠肝组织匀浆上清液, 按操作表操作, 结果如下: 标准曲线: $y = 0.0036x - 0.0127$, 测定孔 A_1 平均值为0.138, A_2 平均值为0.236, 10%小鼠肝组织匀浆蛋白浓度为14.06 gprot/L, 计算结果为:

$$\text{GAPDH活力(U/gprot)} = (0.236 - 0.138 + 0.0127) \div 0.0036 \div 14.06 \div 10 = 0.22 \text{ U/gprot}$$

按说明书操作, 测定小鼠肝组织(10%组织匀浆蛋白浓度14.06 gprot/L, 加样量40 μL)、菠菜组织(10%组织匀浆蛋白浓度2.00 gprot/L, 加样量40 μL)、西葫芦组织(10%组织匀浆蛋白浓度0.08 gprot/L, 加样量40 μL)、 1×10^6 个CHO细胞(1×10^6 个细胞匀浆蛋白浓度0.59 gprot/L, 加样量40 μL)中的GAPDH活力(如下图):



声明

1. 试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，我公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器，严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责，使用前请充分考虑样本可能的使用量，预留充足的样本。

