

叶绿体 3-磷酸甘油醛脱氢酶(NADPH-GAPDH)试剂盒说明书

(分光法 48 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 CO₂ 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 50mL×1 瓶	4℃保存	
提取液二	液体 50mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉剂 mg×1 支	4℃保存	使用前甩几下或离心使试剂落入底部，再加 1.1mL 蒸馏水溶解备用。
试剂二	粉剂 mg×3 支	-20℃保存	使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	使用前甩几下或离心使试剂落入底部，再加 1.1mL 蒸馏水溶解备用。
试剂四	液体 30mL×1 瓶	4℃保存	
试剂五	粉剂 mg×1 支	4℃保存	使用前甩几下或离心使试剂落入底部，再加 1.1mL 蒸馏水溶解备用。

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、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℃）。

③ 在 1mL 石英比色皿中依次加入：

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, $\Delta A = A1 - A2$ 。	

- 【注】** 1. 若 ΔA 的值在零附近, 可以适当延长反应时间到 20min 后读取 A2, 改变后的反应时间需代入计算公式重新计算。或适当加大样本量(如 100μL, 则试剂四相应减少), 则改变后的加样体积需代入计算公式重新计算。
2. 若下降趋势不稳定, 可以每隔 20S 读取一次吸光值, 选取一段线性下降的时间段来参与计算, 相对应的 A 值也代入计算公式重新计算。
3. 若起始值 A1 太大如超过 2 (如颜色较深的植物叶片, 一般色素较高, 则起始值相对会偏高), 可以适当减少样本加样量, 则改变后的加样体积需代入计算公式重新计算。或向待测样本中加少许活性炭混匀静置 5min 后 12000rpm, 4℃离心 10min, 上清液用于检测;
4. 若 ΔA 的值大于 0.5, 则需减少反应时间 (如减少至 5min), 或减少样本量 (如 40μL), 则改变后的反应时间 T 和样本量 V1 需代入计算公式重新计算。

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。

$$\text{NADPH-GAPDH}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T = 193 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

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。

$$\text{NADPH-GAPDH}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T = 193 \times \Delta A \div W$$

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。

$$\text{NADPH-GAPDH}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div V1 \div T = 193 \times \Delta A$$

ϵ ---NADPH 摩尔消光系数, $6.22 \times 10^3 \text{ L} / \text{mol} / \text{cm}$;

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, $0.72\text{mL} = 7.2 \times 10^{-4}\text{L}$;

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。