

线粒体-3-磷酸甘油脱氢酶 (mt-GPD) 活性测定试剂盒说明书

(微板法 96 样)

一、产品简介:

线粒体-3-磷酸甘油脱氢酶 (mt-GPD) 存在于线粒体中, 在 3-磷酸甘油途径中起重要作用, 催化底物 3-磷酸甘油生成磷酸二羟丙酮, 同时生成的电子和氢进入呼吸链参与氧化磷酸化; 在电子传递体 (PMS) 存在下, 使噻唑蓝 (MTT) 还原生成蓝色产物, 通过检测该蓝色产物在 550nm 处的增加速率, 即可得出 mt-GPD 活性大小。

二、试剂盒组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
试剂一	液体 100mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	液体 20mL×1 瓶	4°C保存	
试剂三	液体 0.2mL×1 支	4°C保存	
试剂四	粉剂 mg×2 支	4°C保存	使用前甩几下使试剂落入底部, 每支加 0.6mL 的蒸馏水溶解。一周内用完。
试剂五	粉剂 mg×4 支	-20°C保存	使用前甩几下使试剂落入底部, 每支加 0.3mL 的蒸馏水溶解。一天内用完。
试剂六	液体 17mL×1 瓶	4°C保存	
试剂七	粉剂 mg×1 支	4°C保存	使用前甩几下使试剂落入底部, 临用前加 1.1mL 蒸馏水溶解。

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、可调试移液器、台式离心机、水浴锅、研钵、冰和蒸馏水。

四、线粒体-3-磷酸甘油脱氢酶 (mtGPD) 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、线粒体制备 (提示: 整个线粒体的提取过程须保持 4°C低温环境):

- ① 称取约 0.1g 组织或收集 500 万细菌/细胞, 加入 1mL 试剂一, 用冰浴匀浆器或研钵匀浆, 转移至离心管后于 4°C×700g 离心 10min。
- ② 弃沉淀, 上清液移至另一离心管中, 4°C×12000g 离心 10min。用移液器移除上清液(上清液即胞浆提取物, 可用于测定从线粒体泄漏的酶活性 (此步可选做)), 留下沉淀 (沉淀即为线粒体)。
- ③ 在沉淀 (线粒体) 中加入 200μL 试剂二和 2μL 试剂三, 超声波破碎 (冰浴, 功率 20% 或 200W, 超声 3s, 间隔 10 秒, 重复 30 次), 液体置于冰上用于 **线粒体-3-磷酸甘油脱氢酶 (mtGPD)** 活性测定。

【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, 或按照细菌/细胞数量 (10⁴): 提取液 (mL) 为 500~1000: 1 的比例进行提取。

2、上机检测:

- ① 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 550nm。
- ② 在 96 孔板中依次加入下列试剂:

试剂名称 (μL)	测定管
-----------	-----

样本	20
试剂四	10
试剂五	10
试剂六	150
试剂七	10
混匀后立即在 550nm 处读取 A1 值，5min 后读取 A2。 $\Delta A = A2 - A1$ 。	

【注】：加完试剂四即启动反应，所以试剂四加完需立即检测，若 ΔA 小于 0.01，则增加样本上样量 $V1$ ，试剂六相应减少保持原体系不变（如样本上样量为 40 μ L 时，试剂六为 130 μ L）。则改变后的 $V1$ 需带入计算公式重新计算。

五、结果计算：

1、按样本蛋白浓度计算：

酶活定义：每毫克组织蛋白每分钟还原 1 nmol 噻唑蓝（MTT）定义为一个酶活性单位。

$$\text{mtGPD 活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T = 493.8 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

2、按样本鲜重计算：

酶活定义：每克组织每分钟还原 1 nmol 噻唑蓝（MTT）定义为一个酶活性单位。

$$\text{mtGPD 活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T = 99.8 \times \Delta A \div W$$

3、按细菌或细胞密度计算：

酶活定义：每 1 万个细菌或细胞每分钟还原 1 nmol 噻唑蓝（MTT）定义为一个酶活单位。

$$\text{mtGPD 活性}(\text{nmol}/\text{min} / 10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.2 \times \Delta A$$

ϵ ---还原型 MTT 的摩尔消光系数， $8.1 \times 10^3 \text{ L}/\text{mol}/\text{cm}$ ；

d ---96 孔板光径，0.5cm；

V ---加入提取液体积，0.202mL；

$V1$ ---加入样本体积，0.02 mL；

$V2$ ---反应体系总体积， $2 \times 10^{-4} \text{ L}$ ；

T ---反应时间，5min；

W ---样本质量，g；

500---细菌或细胞总数，500 万；

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。