线粒体-3-磷酸甘油脱氢酶(mt-GPD)活性试剂盒

(微板法 96 样)

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。

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℃保存	
试剂二	液体 20mL×1 瓶	4℃保存	
试剂三	液体 0.2mL×1 支	4℃保存	
试剂四	粉剂 mg×2 支	4℃保存	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℃保存	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℃保存	
试剂七	粉剂 mg×1 支	4℃保存	用前甩几下使试剂落入底部, 临用前加 1.1mL 蒸馏水溶解。

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。

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℃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℃×700g 离心 10min。

② 弃沉淀，上清液移至另一离心管中，4℃×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 (10^4)：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。ΔA=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 0.05，则增加样本上样量 V1,试剂三相应减少保持原体系不变(如样本上样量为 40μL 时,试剂三为 130 μL) 。则改变后的 V1 需带入计算公式重新计算。

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。

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

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。

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

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。

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

ε---还原型 MTT 的摩尔消光系数, 8.1×10^3 L/mol/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, 2×10^{-4} 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。