

3-磷酸甘油氧化酶（GPO）活性测定试剂盒说明书

(货号: BP10182W 微板法 96 样 有效期: 3 个月)

一、指标介绍:

3-磷酸甘油(G3P)被 3-磷酸甘油氧化酶(GPO)氧化生成过氧化氢(H_2O_2), H_2O_2 与 4-氨基氨替吡啉等反应生成红色醌类化合物, 其在 510nm 处有特征吸收峰, 通过检测 510nm 处吸光值变化即可得出 3-磷酸甘油氧化酶(GPO)活性大小。

二、试剂盒的组成和配制:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 100mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	粉剂 1 支	-20℃避光保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底(可手动甩一甩); 2. 再加 1.2mL 蒸馏水溶解备用, 可-20℃分装冻存。
试剂二	液体 12mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂三	液体 7mL×1 瓶	4℃ 避光保存	
标准品	液体 1mL×1 支	4℃ 避光保存	1. 若重新做标曲, 则用到该试剂; 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制; 3. 溶解后的标品一周内用完。

三、实验器材:

研钵(匀浆机)、冰盒(制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅(烘箱、培养箱、金属浴)、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水(去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本(例如不同类型或分组)进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

1、样本提取:

① 组织样本: 取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆。12000rpm, 4℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【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 细菌或细胞: 先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 取约 500 万细菌或细胞, 加入 1mL 提取液, 超声波破碎细菌或细胞(冰浴, 功率 20%或 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次); 12000 rpm, 4℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照细菌/细胞数量(10^4): 提取液(mL)为 500~1000: 1 的比例进行提取。

③ 液体样本: 直接检测; 若浑浊, 离心后取上清检测。

2、检测步骤:

① 酶标仪预热 30min, 调节波长到 510 nm。

② 所有试剂解冻至 37℃或于 37℃水浴锅中水浴 5-10min。

③ 在 96 孔板中依次加入:

试剂组分 (μL)	测定管
样本	20

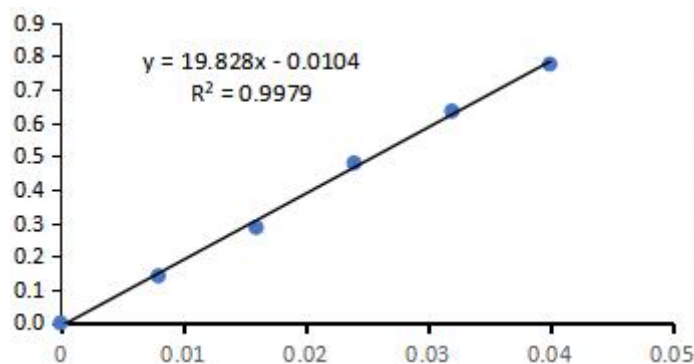
试剂一	10
试剂二	110
试剂三	60
混匀, 立即于 510nm 处读取 A1, 37°C 孵育 30min 后读取 A2, $\Delta A = A2 - A1$ 。	

【注】1. 若 ΔA 较小, 可以增加反应时间 T (如增至 1 小时), 或增加样本量 V1 (由 20 μ L 增至 50 μ L, 则试剂二相应减少), 则改变后的 T 和 V1 需重新代入公式计算。

2. ΔA 最好控制在标准曲线的线性范围内, 若 ΔA 的值超过 1, 可对样本进行稀释再测定, 稀释倍数 D 代入公式计算; 或减少样本量 V1 (如减至 10 μ L, 则试剂二相应增加), 或减少反应时间 T (如减至 10min), 则改变后的 T、V1 和稀释倍数 D 需重新代入公式计算。

五、结果计算:

1、标准曲线方程为 $y = 19.828x - 0.0104$; x 为标准品摩尔质量 (μ mol), y 为 ΔA 。



2、按照样本质量计算:

酶活定义: 每克组织每分钟分解底物生成 1nmol 的 H_2O_2 定义为一个酶活单位(U)。

$$\begin{aligned} \text{GPO 活性 (nmol/min/g 鲜重)} &= [(\Delta A + 0.0104) \div 19.828 \times 10^3] \div (W \times V1 \div V) \div T \times D \\ &= 84.1 \times (\Delta A + 0.0104) \div W \times D \end{aligned}$$

3、按照样本蛋白浓度计算:

酶活定义: 每毫克组织蛋白每分钟分解底物生成 1nmol 的 H_2O_2 定义为一个酶活单位(U)。

$$\begin{aligned} \text{GPO 活性 (nmol/min/mg prot)} &= [(\Delta A + 0.0104) \div 19.828 \times 10^3] \div (Cpr \times V1) \div T \times D \\ &= 84.1 \times (\Delta A + 0.0104) \div Cpr \times D \end{aligned}$$

4、按细胞数量计算:

酶活定义: 每 10^4 个细胞每分钟分解底物生成 1nmol 的 H_2O_2 定义为一个酶活单位(U)。

$$\begin{aligned} \text{GPO 活性 (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} &= [(\Delta A + 0.0104) \div 19.828 \times 10^3] \div (500 \times V1 \div V) \div T \times D \\ &= 84.1 \times (\Delta A + 0.0104) \div 500 \times D \end{aligned}$$

5、按液体体积计算:

酶活定义: 每毫升液体每分钟分解底物生成 1nmol 的 H_2O_2 定义为一个酶活单位(U)。

$$\text{GPO 活性 (nmol/min/mL)} = [(\Delta A + 0.0104) \div 19.828 \times 10^3] \div V1 \div T \times D = 84.1 \times (\Delta A + 0.0104) \times D$$

W---样品质量, g;

V---提取液体积, mL;

V1---上清液体积 (mL), 0.02mL;

T---反应时间, 30 min;

D---稀释倍数, 未稀释即为 1;

500---细胞数量, 万;

Cpr---上清液蛋白质浓度, mg/mL; 建议使用本公司的 BCA 蛋白质含量测定试剂盒。

附: 标准曲线制作过程:

- 1 标准品母液浓度为 250mM，将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0，0.4，0.8，1.2，1.6，2 mM。也可根据实际样本调整标准品浓度。
- 2 标品稀释参照表如下：

1. 吸取标准品母液 40uL，加入 960uL 蒸馏水，混匀得到 10mM 的标品稀释液；						
2.再吸取 10mM 标品稀释液 200ul，加入 800ul 蒸馏水，混匀得到 2mM 的标品稀释液待用。						
标品浓度 mM	0	0.4	0.8	1.2	1.6	2
标品稀释液 uL	0	40	80	120	160	200
水 uL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

- 3 依据测定管加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。

试剂名称 (μL)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	20	
蒸馏水		20
试剂一	10	10
试剂二	110	110
试剂三	60	60
混匀，于 510nm 处读取各管吸光值， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{0 浓度管}}$		