**线粒体-3-磷酸甘油脱氢酶(mt-GPD)活性试剂盒**

**分光法48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60mL×1瓶 | 4℃保存 |  |
| **试剂二** | 液体15mL×1瓶 | 4℃保存 |  |
| **试剂三** | 液体0.5mL×1支 | 4℃保存 |  |
| **试剂一** | 粉剂mg×2支 | 4℃保存 | 用前甩几下使试剂落入底部，每支加 1.2mL 的蒸馏水溶解。一周内用完。 |
| **试剂二** | 粉剂mg×4支 | -20℃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。一天内用完。 |
| **试剂三** | 液体35mL×1瓶 | 4℃保存 |  |
| **试剂四** | 粉剂mg×1支 | 4℃保存 | 用前甩几下使试剂落入底部，临用前加 4.4mL 蒸馏水溶解。 |

**所需的仪器和用品:**

可见分光光度计、石英比色皿(光径 1cm)、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（10⁴）：提取液（mL）为 500~1000：1 的比例进行提取。

**2、上机检测：**

**①** 可见分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 550nm，蒸馏水调零。

**②** 在 EP 管中依次加入下列试剂：

|  |  |
| --- | --- |
| **试剂名称（μL）** | **测定管** |
| **样本** | 80 |
| **试剂一** | 40 |
| **试剂二** | 40 |
| **试剂三** | 600 |
| **试剂四** | 40 |
| 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 160μL时，试剂三为 520μL）。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。

mtGPD 活性（nmol/min/mg prot）＝[ΔA×V2÷（ε×d）×10⁹]÷(V1×Cpr) ÷T=247×ΔA÷Cpr

1. **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。

mtGPD 活性（nmol/min/g 鲜重）＝[ΔA×V2÷（ε×d）×10⁹]÷(W×V1÷V)÷T=49.9×ΔA÷W。

1. **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。

mtGPD 活性（nmol/min /104 cell）＝[ΔA×V2÷（ε×d）×10⁹]÷(500×V1÷V)÷T=0.1×ΔA

ε---还原型 MTT 的摩尔消光系数，8.1×10

3 L/mol/cm； d---比色皿光径，1cm；

V---加入提取液体积，0.202mL； V1---加入样本体积，0.08mL；

V2---反应体系总体积，8×10

-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。