

线粒体-3-磷酸甘油脱氢酶 (mt-GPD) 活性测定试剂盒说明书

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：

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℃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 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 550nm。

② 所有试剂解冻至室温 (25℃)，在 96 孔板中依次加入下列试剂：

□

【注】：加完试剂七即启动反应，所以试剂七加完需立即检测，若 ΔA 小于 0.05，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 40μL 时，试剂六为 130μL）。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。mtGPD 活性 (nmol/min/mg prot) = $[\Delta A \times V_2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_1 \times Cpr) \div T = 493.8 \times \Delta A \div Cpr$

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。mtGPD 活性 (nmol/min/g 鲜重) = $[\Delta A \times V_2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_1 \div V) \div T = 99.8 \times \Delta A \div W$

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) 定为一个酶活单位。mtGPD 活性 (nmol/min / 10⁴ cell) = $[\Delta A \times V_2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_1 \div V) \div T = 0.2 \times \Delta A$

ε---还原型 MTT 的摩尔消光系数，8.1×10³ 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。