线粒体-3-磷酸甘油脱氢酶（mt-GPD）活性测定试剂盒说明书

（货号：G0917F 分光法 48 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 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。

三、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。

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（10^4）：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 0.01，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 160μL 时，试剂六为 520μL）。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)=[ΔA×V2÷(ε×d)×10^9]÷(V1×Cpr)÷T=247×ΔA÷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)=[ΔA×V2÷(ε×d)×10^9]÷(W×V1÷V)÷T=49.9×ΔA÷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。

mtGPD 活性(nmol/min/104 cell)=[ΔA×V2÷(ε×d)×10^9]÷(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。