



GPDH Assay Kit

Measure glycerol-3-phosphate dehydrogenase in precursor adipocytes,

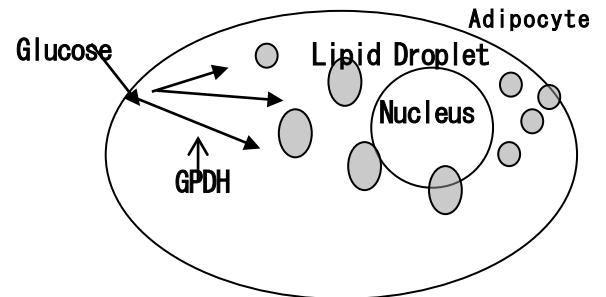
Code No. AK01

March 27, 2020

Description

The adipose tissue works as a place energy store in vivo. The way to do that is turning the energy derived from foods into fat by enzymes has a role in fat synthesis. Among the enzymes, glycerol 3 -phosphate dehydrogenase (GPDH) is most measured enzyme that to analyze fat synthesis activity of adipose tissue and adipocyte.

This kit has several advantages, in measuring the enzyme activity, over the traditional methods, which include higher stability and reproducibility.



The decrease of NADH is measured at 340nm by spectrophotometry.

Components/Storage

Component	Quantity	Form	Stability
SUBSTRATE	10 bottles (1 bottle=10 tests)	Freeze Dry	-20°C
ENZYME EXTRACTION REAGENT	1 bag	Powder	-20°C

One kit contains reagents for 100 samples

Preparation of reagents

• SUBSTRATE SOLUTION

Add one bottle of SUBSTRATE to 4.2 mL of distilled water and mix.

Note: This working solution can be stored at 4°C for 2 days.

• ENZYME EXTRACTION SOLUTION

Add one bag of ENZYME EXTRACTION REAGENT to 200 mL of distilled water and mix.

Note: This working solution can be stored at 4°C for 4 weeks.

Sample Preparation – cultured cells

1. Remove culture medium and wash the cells twice with 500µl PBS.
2. Add enzyme extraction solution to each well. For a 24-well plate, apply 0.5~1mL per well.
3. Homogenize the cell extract by using a sonicator.

Assay procedure

1. Add 400µL of substrate solution to spectrometer cuvette (quartz micro cuvette), and warm at 25°C (About 5 minutes). Hopefully use spectrometer keep warm at 25°C. When couldn't, wait until substrate solution become room temperature. In same way, warm samples at 25°C.
2. Add 200µL of sample to cuvette and mix it well. Measure decrease of absorbance at 340nm, and find amount of absorbance change per minute (Δ O.D.). Use kinetic program on spectrometer. If don't have it, time measurement with timer. In general, measure for 3~10minutes.

Note 1: As described in example data, find slope (Δ O.D.) on linearity area.

Note 2: It is possible to measure for a maximum of 500 samples, if use 96well micro-plates reader.

Calculation of GPDH activity

One unit is activity of 1 μ mol NADH example by GPDH per minute per 1mL sample. Based on this, GPDH activity is found following equation. (Only light path is 1cm)

$$\text{GPDH activity (U/ml)} = \Delta\text{O.D.}(340\text{nm})/\text{min} \times 0.482^*$$

($\Delta\text{O.D.}$: value of absorbance change at 340nm)

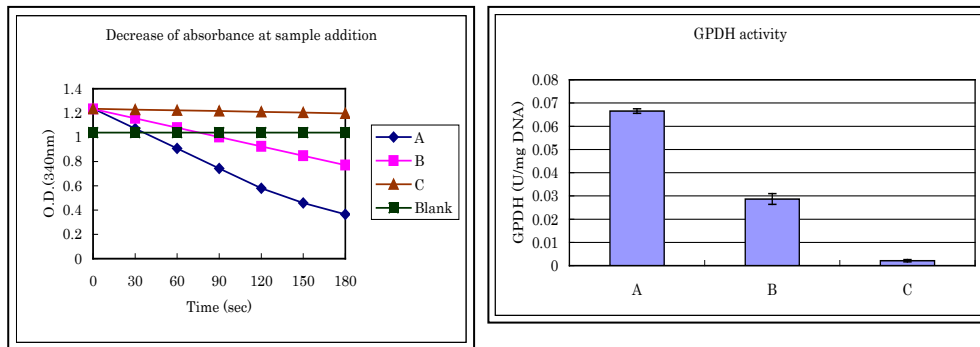
*96well plate

Light path (cm) = total amount of reaction (mL) / area of the bottom of well (cm²)

Example data

Effect of Troglitazone on GPDH activity in 3T3-L1 cell cultures

GPDH activities were measured with GPDH Assay Kit. A, 3T3-L1 adipocytes treated with Troglitazone; B, 3T3-L1 adipocytes; C, 3T3-L1 preadipocytes.



References

- (1) Tashiro, K., Inamura, M., Kawabata, K., Sakurai, F., Yamanishi, K., Hayakawa, T., Mizuguchi, H. Efficient Adipocyte and Osteoblast Differentiation from Mouse Induced Pluripotent Stem Cells by Adenoviral Transduction. *Stem Cells*. 27, 1802-1811 (2009)
- (2) Nagane, K., Jo, J., Tabata, Y. Promoted Adipogenesis of Rat Mesenchymal Stem Cells by Transfection of Small Interfering RNA Complexed with a Cationized Dextran. *Tissue Eng. Part A*. 16, 21-31(2010)
- (3) Matsumura, K., Bae, JY., Hyon SH. Polyampholytes as Cryoprotective Agents for Mammalian Cell Cryopreservation. *Cell Transplant*. 19, 691-699 (2010)
- (4) Jiao, WH., Gao, H., Li, CY., Zhou, GX., Kitanaka, S., Ohmurae, A., Yao, XS. beta-Carboline Alkaloids from The Stems of *Picrasma quassioides*. *Magn. Reson. Chem*. 48, 490-495 (2010)

Notice to Purchaser

This product is to be used for Research Purposes Only. It is not to be used for Drug or Diagnostic Purposes, nor is it intended for Human Use. Primary cell products may not be resold, modified for resale, or used to manufacture commercial products without the express written consent of Primary Cell Co., Ltd.

Except as otherwise expressly set forth in this use manual, Primary Cell dose not make any representation or warranties or conditions of any kind, either express or implied, with respect to the products, or information disclosed hereunder, including, but not limited to, the implied warranties of merchantability, fit for a particular purpose, or noninfringement of the intellectual property rights of third parties.



COSMO BIO Co., LTD.

【JAPAN】

TOYO EKIMAE BLDG. 2-20, TOYO 2-CHOME,
KOTO-KU. TOKYO 135-0016, JAPAN
Phone: +81-3-5632-9610
FAX: +81-3-5632-9619
URL: <https://www.cosmobio.co.jp/>



COSMO BIO USA

【Outside Japan】

2792 Loker Ave West, Suite 101
Carlsbad, CA 92010, USA
email: info@cosmobioussa.com
Phone/FAX: (+1) 760-431-4600
URL: www.cosmobioussa.com

For research use only. Not for clinical diagnosis.

GPDH 活性測定キット

(GPDH Assay Kit, Code No. AK01)

2020年3月27日改訂

※本品は、研究目的にのみご使用ください。

脂肪組織は、生体内でエネルギーの貯蔵の場として働いています。その方法は食物より得られたエネルギーを脂肪合成に關与する各酵素の作用により脂肪に変える事で行っています。

それらの酵素の中で、グリセロール3リン酸脱水素酵素（GPDH）は、ジヒドロキシアセトンリン酸とグリセロール3リン酸とを変換に作用する酵素であり、生じたグリセロール3リン酸と脂肪酸とのエステル結合したトリグリセリドが脂肪組織に蓄えられます。そのためGPDHは脂肪組織、脂肪細胞の脂肪合成活性を知るために最も多く測られてきた酵素です。

本品は、これまで行われてきた方法を、より簡便に、より安定した測定が可能ないように、試薬の構成および安定化剤の選択等について検討を行い、購入後すぐにGPDHの酵素活性を測定できるようにした測定キットです。

《I-1. キット構成》

内容	容量	本数	保存温度	取扱上の注意
反応基質 Substrate	4.2ml 用	10 本	-20℃	取扱う際には眼鏡・手袋などの保護具を着用の上、人体の接触を避けるよう十分に配慮してください。
酵素抽出試薬 Enzyme Extraction Reagent	200ml 用	1 袋	-20℃	

※本製品は、10回100検体分（1回に10検体）を測定することができます。

※精製水、PBSを別途にご用意願います。

※本製品の測定は、波長340nmを測定できる分光光度計が必要になります。

《I-2. キットの特徴》

- ・酵素活性測定に必要な試薬類がパッケージングしている。
- ・紫外・可視分光光度計を用いて簡便に定量。

《I-3. 測定原理》

測定原理は、下記の反応におけるNADHの減少を波長340nmの吸光度変化で測定する方法です。



《II-1. 反応基質溶液の調製》

反応基質のバイアル1本に対して精製水4.2mlを加えて溶解し、その溶液を反応基質溶液とします。反応基質溶液は使用するまで氷上で保管してください。反応基質溶液の保存は、4℃で2日間安定です。

《II-2. 酵素抽出溶液の調製》

酵素抽出試薬の袋の内容物を精製水200mlで溶解し、その溶液を酵素抽出液とします。反応基質溶液は使用するまで氷上で保管してください。酵素抽出液の保存は、4℃で4週間安定です。

《Ⅱ-3. 検体の調製法 —細胞を 24well プレートで培養した場合—》

- (1) 24 ウェルプレートで培養した細胞をご用意ください。
- (2) 培養液を除去後、1 ウェルあたり 500 μ l の PBS で 2 回洗浄してください。
- (3) PBS を除去後、酵素抽出溶液を 1 ウェルあたり 0.5~1.0ml 加えてください。
- (4) プレートを氷上等で冷却しながら超音波破碎機を用いて細胞を破碎します。
- (5) 超音波処理した溶液を回収し、冷却遠心 (4 $^{\circ}$ C、12,800g、5 分間) で分離した上清を検体とします。調製した検体を保存(-80 $^{\circ}$ C)した場合、酵素活性が低下するため、可能な限り調製当日中に酵素活性の測定に供してください。

《Ⅲ-1. 測定方法》

- (1) 反応基質溶液 400 μ l を分光光度計用セル (石英マイクロセル) に入れ、25 $^{\circ}$ C に加温し (通常 5 分程度)、検体も 25 $^{\circ}$ C に保温します。
 ※25 $^{\circ}$ C に温度制御できる試料室で測定することが好ましいです。温度制御の無い試料室の場合は、予め反応基質溶液・検体を室温に戻してから使用してください。
- (2) セル内に検体 200 μ l を加え、良く攪拌した後、波長 340nm における吸光度の減少を経時測定し、1 分間当りの吸光度の変化量 (Δ O.D.) を求めます。分光光度計にカイネチクス測定 of プログラムがあればこれを使います。無ければ、ストップウォッチで時間を計りながら測定します。通常、3 分~10 分の測定を行います。
 ※実施例のサンプルにあるように直線性のあるところで傾き (Δ O.D.) を求めます (実施例参照)。
 ※96 ウェルマイクロプレートリーダーを利用すれば最大 500 検体の測定が可能です (マイクロセルの 1/5 スケールで行ってください)。96 ウェルプレートは UV 透過タイプを使用してください

《Ⅲ-2. 活性値の計算》

検体 1ml 当りの GPDH が 1 分間に 1 μ mole の NADH を消費する活性を 1 U とすると、GPDH 活性は次式で求められます (光路長が 1cm の場合)。

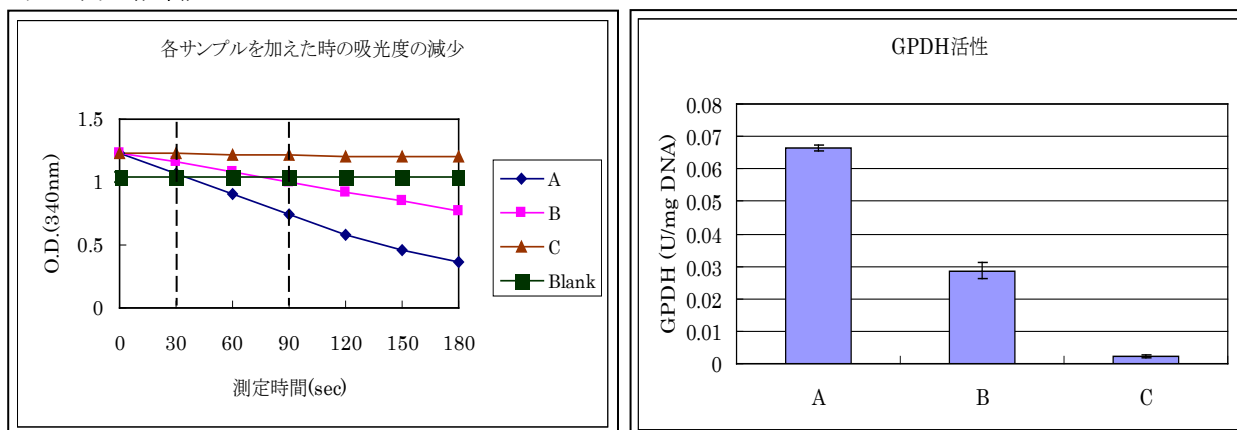
$$\begin{aligned} \text{GPDH 活性 (U/ml)} &= \Delta\text{O.D.} \times 0.482 \\ &= \frac{\Delta\text{O.D.}}{6.22(\text{NADH のミリモル分子吸光係数})} \times \frac{0.6(\text{ml 反応総量})}{0.2(\text{ml 検体量})} \times \frac{\text{検体希釈率}}{1(\text{cm 光路長})} \end{aligned}$$

Δ O.D. : 1 分間当りの波長 340nm における吸光度の変化量

※96 ウェルプレートで測定した場合の光路長は、ウェルを円柱とみなして簡易的に下記の方法で求める事ができます。ただし光路長はおよその長さのため、厳密に酵素活性を求める場合はセルを使用してください

$$\text{光路長(cm)} = \text{反応総量(ml)} \div \text{使用プレートのウェルの底面積(cm}^2\text{)}$$

《Ⅳ. 実施例の結果》



《V. 主要文献》

- 1) Kozak, L. P., and Jensen, J. T. (1974) *J.Biol.Chem.* **249**, 7775-7781
- 2) Green, H., and Kehinde, O. (1974) *Cell* **1**, 113-116
- 3) Green, H., and Kehinde, O. (1976) *Cell* **7**, 105-113
- 4) Wise, L. S., and Green, H., (1979) *J.Biol.Chem.* **254**, 273-275
- 5) Kawada, T., Aoki, N., Kamei, Y., Maeshige, K., Nishiu, S., and Sugimoto, E. (1990) *Comp.Biochem.Physiol.* **96A**, No.2, 323-326
- 6) 山田信博, 佐藤靖史 細胞工学別冊 医学実験マニュアルシリーズ2 動脈硬化+高脂血症研究ストラテジー 408-411

《本製品をご利用になられた文献、発表データ》

本製品をご利用いただき投稿された論文、学会発表パネルなどを送付いただきましたお客様に粗品を進呈させていただきます。ご提供いただきました論文などは、WEB やカタログ、技術資料を通じて多くの研究者の方への技術情報として利用させていただく場合がございます。是非皆様のご協力をお願いいたします。

送付先：〒047-0261 北海道小樽市銭函3丁目513番2
コスモ・バイオ株式会社 札幌事業部 あて郵送
または primarycell@cosmobio.co.jp あてPDFファイル送信



コスモ・バイオ株式会社
COSMO BIO CO., LTD.

〒135-0016 東京都江東区東陽 2-2-20 東陽駅前ビル
URL : <http://www.cosmobio.co.jp/>

● 営業部 (お問い合わせ)
TEL : (03) 5632-9610 FAX : (03) 5632-9619
TEL : (03) 5632-9620

● 札幌事業部 (技術的なお問い合わせ)
TEL : (0134) 61-2301 FAX : (0134) 61-2295
E-mail : primarycell@cosmobio.co.jp