



For research use only. Not for clinical diagnosis.

GPDH Assay Kit

(Catalog No. AK01)

July 1, 2024

• 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	Storage
Substrate	10 bottles (1 bottle=10 tests)	Freeze Dry	-20°C
Enzyme Extraction Reagent	1 bag	Powder	-20°C

• 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 (quarts 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)

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

(Δ O.D. : value of absorbance change at 340nm)

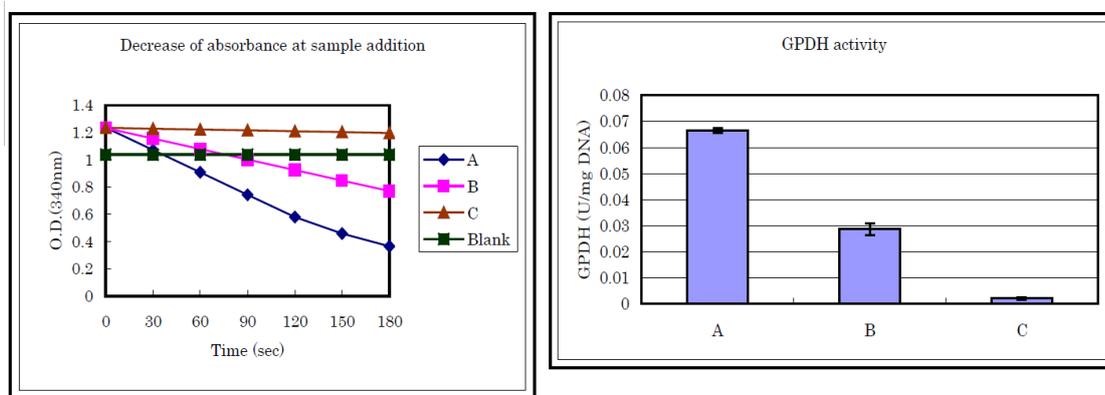
*96well plate

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) 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) 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)
- 7) 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)
- 8) Matsumura, K., Bae, JY., Hyon SH. Polyampholytes as Cryoprotective Agents for Mammalian Cell Cryopreservation. *Cell Transplant.* **19**, 691-699 (2010)
- 9) 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)

GPDH 活性測定キット

(GPDH Assay Kit, 品番 : AK01)

2024年7月1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関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
反応基質 Substrate	4.2ml 用	10 本	-20°C
酵素抽出試薬 Enzyme Extraction Reagent	200ml 用	1 袋	-20°C

※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°C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°C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ックス測定のパ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)。

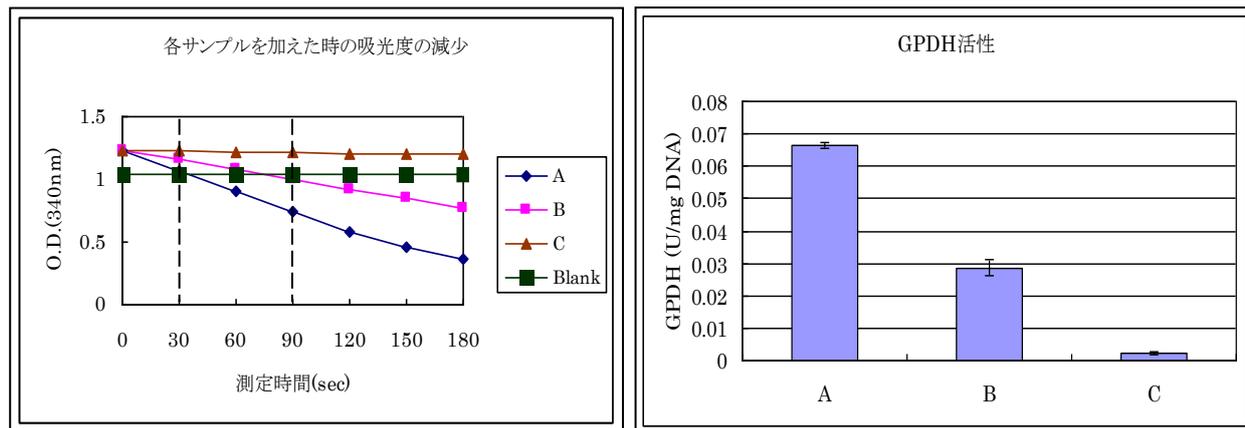
$$\begin{aligned} \text{GPDH 活性 (U/ml)} &= \Delta\text{O.D.} \times 0.482 \\ &= \frac{\Delta\text{O.D.}}{6.22(\text{NADH のミリモル分子吸光係数})} \times \frac{0.6(\text{ml 反応総量})}{0.2(\text{ml 検体量})} \times \frac{\text{検体希釈率}}{1(\text{cm 光路長})} \end{aligned}$$

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. 参考文献》

- 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
- 7) 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)
- 8) 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)
- 9) Matsumura, K., Bae, JY., Hyon SH. Polyampholytes as Cryoprotective Agents for Mammalian Cell Cryopreservation. *Cell Transplant.* 19, 691-699 (2010)
- 10) 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)