

3-磷酸甘油酸激酶(PGK)活性检测试剂盒说明书

(货号: ADS-W-PGK001 微板法 96 样)

一、产品简介:

3-磷酸甘油酸激酶(PGK)是糖酵解的关键酶,广泛存在于动植物和微生物体内,催化 3-磷酸甘油酸和 ATP 反应产生 1,3-二磷酸甘油酸,后者在 3-磷酸甘油醛脱氢酶和 NADH 作用下产生 3-磷酸甘油醛和 NAD^+ ,通过测定 NADH 的下降量,进而得到 3-磷酸甘油酸激酶(PGK)的活性大小。

二、试剂盒的组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 100mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉剂 1 支	-20℃保存	用前甩几下或离心使试剂落入底部,再加 1.1mL 蒸馏水溶解备用,溶解好的试剂可-20℃分装冻存。
试剂二	粉剂 3 支	4℃保存	用前取一支甩几下或离心使试剂落入底部,再加 0.4mL 蒸馏水溶解备用,溶解好的试剂可-20℃分装冻存(溶解好的一个月内用完)。
试剂三	液体 1 支	-20℃保存	用前甩几下或离心使试剂落入底部,再加 1.1mL 蒸馏水溶解备用,溶解好的试剂可-20℃分装冻存。
试剂四	液体 15mL×1 瓶	4℃保存	
试剂五	粉剂 1 支	-20℃保存	用前甩几下或离心使试剂落入底部,再加 1.1mL 蒸馏水溶解备用。

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、可调式移液器、天平、震荡仪、低温离心机、研钵。

四、3-磷酸甘油酸激酶(PGK)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、样本制备:

① 组织样本:

称取约 0.1g 组织样本,加入 1mL 提取液,冰浴匀浆后于 4℃,12000rpm 离心 5min,取上清液体待测。

【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。

② 细菌/细胞样本:

先收集细菌或细胞到离心管内,离心后弃上清;取约 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液,超声波破碎细菌或细胞(冰浴,功率 200W,超声 3s,间隔 10s,重复 30 次);12000rpm 4℃离心 10min,取上清,置冰上待测。

【注】:若增加样本量,可按照细菌/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 酶标仪预热 30min,调节波长至 340nm,设定温度 25℃。

② 所有试剂解冻至室温(25℃)。

③ 在 96 孔板中依次加入:

试剂名称(μL)	测定管
----------	-----

样本	20
试剂一	10
试剂二	10
试剂三	10
试剂四	140
混匀，室温（25℃）条件下，孵育 10min	
试剂五	10
轻轻混匀，室温（25℃）条件下，30s 时于 340nm 处读取吸光值 A1，10min 后再读取 A2， $\Delta A = A1 - A2$ 。	

- 【注】1. 若 ΔA 的值在零附近，可以适当延长反应时间到 20min 后读取 A2，改变后的反应时间需代入计算公式重新计算。或适当加大样本量（如 40 μ L，则试剂四相应减少），则改变后的加样体积需代入计算公式重新计算。
2. 若下降趋势不稳定，可以每隔 20S 读取一次吸光值，选取一段线性下降的时间段来参与计算，相对应的 A 值也代入计算公式重新计算。
3. 若起始值 A1 太大如超过 2（如颜色较深的植物叶片，一般色素较高，则起始值相对会偏高），可以适当减少样本加样量，则改变后的加样体积需代入计算公式重新计算。
或向待测样本中加少许活性炭混匀静置 5min 后 12000rpm, 4℃离心 10min，上清液用于检测；
4. 若 ΔA 的值大于 0.5，则需减少反应时间（如减少至 5min），或减少样本量（如 10 μ L），则改变后的反应时间 T 和样本量 V1 需代入计算公式重新计算。

五、结果计算：

1、按照样本质量计算：

酶活定义：每克组织每分消耗 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$GPK(nmol/min/g \text{ 鲜重}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T = 321.6 \times \Delta A \div W$$

2、按样本蛋白浓度计算：

单位定义：每毫克组织蛋白每分钟内氧化 1nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$GPK(nmol/min/mg \text{ prot}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (V1 \times Cpr) \div T = 321.6 \times \Delta A \div Cpr$$

3、按细菌/细胞数量计算：

单位定义：每 10⁴ 个细胞每分钟内氧化 1nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$GPK(nmol/min/10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.64 \times \Delta A \div Cpr$$

ϵ ---NADH 摩尔消光系数，6.22 $\times 10^3$ L / mol /cm；

d---比色皿光径，0.5cm；

V---加入提取液体积，1mL；

V1---加入样本体积，0.02mL；

V2---反应体系总体积，0.2mL=2 $\times 10^{-4}$ L；

T---反应时间，10min；

W---样本质量，g；

500---细胞数量，万；

Cpr---上清液蛋白质浓度，mg/mL；建议使用本公司的 BCA 蛋白质含量测定试剂盒。