

叶绿体 3-磷酸甘油酸激酶(PGK)试剂盒说明书

(货号: BP10212F 紫外法 48 样 有效期: 3 个月)

一、指标介绍:

叶绿体 3-磷酸甘油酸激酶(PGK)是卡尔文循环中的关键酶, 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-磷酸甘油酸激酶的活性大小。

二、试剂盒的组成和配制:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液一	液体 50mL×1 瓶	4℃保存	
提取液二	液体 50mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉剂 1 瓶	-20℃避光保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部(可手动甩一甩); 2. 加入 2.2mL 蒸馏水溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂二	粉剂 3 支	4℃保存	每支: 1. 临用前 8000g 4 ° C 离心 2min 使试剂落入管底; 2. 加入 0.4mL 蒸馏水溶解备用。 用不完的试剂分装后-20℃保存, 禁止反复冻融, 三天内用完。
试剂三	液体 1 支	-20℃保存	1. 临用前 8000g 4 ° C 离心 2min 使试剂落入管底; 2. 加 1.1mL 蒸馏水溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂四	液体 35mL×1 瓶	4℃保存	
试剂五	粉剂 1 支	-20℃保存	1. 临用前 8000g 4 ° C 离心 2min 使试剂落入管底; 2. 加入 1.1mL 蒸馏水溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。

三、实验器材:

研钵(匀浆机)、冰盒(制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅(烘箱、培养箱、金属浴)、1ml 石英比色皿、离心管、紫外分光光度计、震荡仪、蒸馏水(去离子水、超纯水均可)。

三、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本(例如不同类型或分组)进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

1、样本提取:

称取约 0.1g 植物组织样本, 加入 1mL 提取液一, 快速冰浴匀浆后于 4℃, 1600rpm 离心 5min, 弃沉淀, 取上清再 4℃, 5000rpm 离心 15min, 弃上清留沉淀, 向沉淀中加 1mL 提取液二, 强力涡旋震

荡 15s，置于冰上(或冰箱)在 4℃孵育 15min，4℃，13000rpm 离心 5min，取上清测定叶绿体中 3-磷酸甘油酸激酶(PGK)的酶活性。提示：整个叶绿体的提取过程须保持 4℃低温环境。

【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、检测步骤：

① 紫外分光光度计预热 30min，调节波长至 340nm，设定温度 25℃，蒸馏水调零。

② 所有试剂解冻至室温（25℃）。

③ 在 1mL 石英比色皿（光径 1cm）中依次加入：

试剂组分（μL）	测定管
样本	80
试剂一	40
试剂二	20
试剂三	20
试剂四	600
混匀，室温（25℃）条件下，孵育 10min	
试剂五	20
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 100μL，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 20μL），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。

$$\text{NADH-GPK}(\text{nmol/min/g 鲜重}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T = 156.8 \times \Delta A \div W$$

2、按样本蛋白浓度计算：

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

$$\text{NADH-GPK}(\text{nmol/min/mg prot}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (V1 \times Cpr) \div T = 156.8 \times \Delta A \div Cpr$$

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

d---比色皿光径，1cm；

V---加入提取液体积，1mL；

V1---加入样本体积，0.08mL；

V2---反应体系总体积, $0.78\text{mL}=7.8\times 10^{-4}\text{L}$;

T---反应时间, 10min;

W---样本质量, g。

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。