

3-磷酸甘油酸激酶(PGK)活性检测试剂盒说明书

(货号: BP10241W 微板法 96 样 有效期: 3 个月)

一、指标介绍:

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:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 100mL×1 瓶	4℃避光保存	
试剂一	粉剂 1 支	-20℃避光保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使粉剂落入管底(可手动甩一甩); 2. 加入 1.1mL 蒸馏水溶解备用; 3. 溶解好的试剂可-20℃分装冻存。
试剂二	粉剂 3 支	4℃保存	每支: 1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使粉剂落入管底(可手动甩一甩); 2. 加入 0.4mL 蒸馏水溶解备用; 3. 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	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底(可手动甩一甩); 2. 加入 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	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使粉剂落入管底(可手动甩一甩); 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)、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水(去离子水、超纯水均可)。

四、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:

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、检测步骤:

- 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:

试剂组分 (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 40μL, 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 10μL), 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。

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

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。

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

3、按细菌/细胞数量计算:

单位定义: 每 10^4 个细胞每分钟内氧化 1nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

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

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

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= 2×10^{-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。