

3-磷酸甘油酸激酶 (PGK) 活性检测试剂盒说明书

紫外分光光度法

货号: AC10410

规格: 50T/48S

产品组成: 使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致, 有疑问请及时联系本公司工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 60 mL×1 瓶	4°C保存
试剂一	液体 25 mL×1 瓶	4°C保存
试剂二	粉剂×1 瓶	-20°C保存
试剂三	粉剂×1 支	-20°C保存
试剂四	粉剂×3 支	-20°C保存
试剂五	粉剂×1 瓶	-20°C保存

溶液的配制:

- 1、试剂二: 临用前加入 5 mL 蒸馏水充分溶解后待用, 用不完的试剂分装后-20°C保存, 禁止反复冻融;
- 2、试剂三: 临用前加入 2.5 mL 蒸馏水充分溶解, 用不完的试剂分装后-20°C保存, 禁止反复冻融;
- 3、试剂四: 临用前加入 1 mL 蒸馏水充分溶解, 用不完的试剂分装后-20°C保存, 禁止反复冻融;
- 4、试剂五: 粉剂置于试剂瓶内棕色管中。临用前加入 10 mL 蒸馏水充分溶解, 用不完的试剂分装后-20°C保存, 禁止反复冻融;
- 5、工作液的配制: 按照蒸馏水: 试剂一: 试剂二: 试剂三: 试剂四: 试剂五=6:10:2:1:1:4的体积比例充分混匀, 现用现配。

产品说明:

3-磷酸甘油酸激酶是糖酵解的关键酶, 也是生物得以生存的关键酶。广泛存在于动植物和微生物体内, 具有影响 DNA 复制和修补及刺激病毒 RNA 合成等生物学功能, 广泛应用于药物靶标设计。

3-磷酸甘油酸激酶催化 3-磷酸甘油酸和 ATP 产生 1,3-二磷酸甘油酸和 ADP, 1,3-二磷酸甘油酸在 3-磷酸甘油醛脱氢酶和 NADH 作用下产生 3-磷酸甘油醛、NAD 和磷酸, 引起 340nm 处的吸光度下降, 即反映了 3-磷酸甘油酸激酶的活性的高低。

注意: 实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品:

紫外分光光度计、低温台式离心机、水浴锅、1mL 石英比色皿、可调式移液枪、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水。

操作步骤:**一、样本处理 (可适当调整待测样本量, 具体比例可以参考文献)**

组织: 按照组织质量 (g): 提取液体积(mL)为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液) 进行冰浴匀浆, 然后 10000g, 4°C, 离心 10min, 取上清置于冰上待测。

细胞：按照细胞数量（10⁴个）：提取液体积（mL）为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细胞加入 1mL 提取液），冰浴超声波破碎细胞（功率 300w，超声 3 秒，间隔 7 秒，总时间 3min）；然后 10000g，4℃，离心 10min，取上清置于冰上待测。

血清/血浆：直接检测。

二、测定步骤

1、分光光度计预热30min以上，调节波长至340nm，蒸馏水调零。

2、样本测定：(在1mL石英比色皿分别加入下列试剂)

试剂名称 (μL)	空白管	测定管
工作液	900	900
样本		100
蒸馏水	100	

在1mL石英比色皿中分别加入上述试剂，充分混匀后于340nm处测定10s时的吸光值A1，迅速置于37℃（哺乳动物）或25℃（其他物种）水浴或培养箱5min，拿出迅速擦干测定310s时的吸光值A2，计算ΔA测定管=A1测定-A2测定，ΔA空白管=A1空白-A2空白，ΔA=ΔA测定管-ΔA空白管。（空白管只需做1-2次）

三、PGK活性计算

1、按照样本蛋白浓度计算

酶活单位定义：每毫克组织蛋白每分钟消耗 1nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$PGK (U/mg \text{ prot}) = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反总} \times 10^9 \div (V \text{ 样} \times C_{pr}) \div T = 321.54 \times \Delta A \div C_{pr}$$

2、按照样本质量计算

酶活单位定义：每克组织每分钟消耗 1nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$PGK (U/g \text{ 质量}) = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反总} \times 10^9 \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 321.54 \times \Delta A \div W$$

3、按照液体体积计算

酶活单位定义：每 mL 血清（浆）每分钟消耗 1nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$PGK (U/mL) = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反总} \times 10^9 \div V \text{ 样} \div T = 321.54 \times \Delta A$$

4、按照细胞数量计算

酶活单位定义：每 10⁴ 个细胞每分钟消耗 1nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$PGK (U/10^4 \text{ cell}) = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反总} \times 10^9 \div (500 \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 0.643 \times \Delta A$$

V 反总：反应体系总体积，1×10⁻³L；ε：NADH 摩尔消光系数，6.22×10³ L/mol/cm；d：比色皿光径，1cm；V 样：加入样本体积，0.1mL；V 样总：加入提取液体积，1mL；T：反应时间，5min；C_{pr}：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；500：500 万个细胞；10⁹：单位换算系数，1mol=10⁹nmol。

注意事项：

- ΔA 大于 0.8 或者 A1 测定小于 0.9 时，建议将粗酶液用提取液稀释后再进行测定。当 ΔA 小于 0.01 时，可以延长反应时间（10min 或 15min）或增加样本体积来测定。
- 空白管为检测各试剂组分质量的检测孔，正常情况下，变化不超过 0.01。
- 样本的蛋白浓度需自行测定，由于提取液中含有一定浓度的蛋白（约 1mg/mL），所以测定样本蛋白浓度时需扣除提取液自身蛋白浓度。

实验实例：

1、取 0.1g 白菜加入 1mL 提取液进行匀浆研磨，取上清后再用提取液稀释 4 倍，之后按照测定步骤操作，测得计算 ΔA 测定管=A1 测定-A2 测定=1.126-0.654=0.472， ΔA 空白管=A1 空白-A2 空白=0.916-0.914=0.002， $\Delta A=\Delta A$ 测定管- ΔA 空白管=0.472-0.002=0.47，按样本质量计算酶活得：

$$\text{PGK (U/g 质量)} = 321.54 \times \Delta A \div W \times \text{稀释倍数} = 321.54 \times 0.47 \div 0.1 \times 4 = 6044.952 \text{ U/g 质量。}$$

2、取 0.1g 小鼠肌肉加入 1mL 提取液进行匀浆研磨，取上清后再用提取液稀释 20 倍，之后按照测定步骤操作，测得计算， ΔA 测定管=A1 测定-A2 测定= 0.908-0.35=0.558， ΔA 空白管=A1 空白-A2 空白=0.916-0.914=0.002， $\Delta A=\Delta A$ 测定管- ΔA 空白管=0.558-0.002=0.556，按样本质量计算酶活得：

$$\text{PGK (U/g 质量)} = 321.54 \times \Delta A \div W \times \text{稀释倍数} = 321.54 \times 0.556 \div 0.1 \times 20 = 35755.248 \text{ U/g 质量。}$$

3、取骆驼血清样本 100uL 按照测定步骤直接测定，测得计算， ΔA 测定管=A1 测定-A2 测定= 0.966-0.907=0.059， ΔA 空白管=A1 空白-A2 空白=0.916-0.914=0.002， $\Delta A=\Delta A$ 测定管- ΔA 空白管=0.059-0.002=0.057，按液体体积计算酶活得：

$$\text{PGK (U/mL)} = 321.54 \times \Delta A = 321.54 \times 0.057 = 18.328 \text{ U/mL。}$$