

3-Phosphoglycerate Kinase Activity Assay Kit

3-磷酸甘油酸激酶(PGK)活性检测试剂盒说明书

货号: BN72009 | 方法: 微板法 | 规格: 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 mg×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 mg×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(溶解好的一个月内存用)。
试剂三	液体 μL ×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	液体 1.1mL×1 支	4℃保存	

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、水浴锅、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℃), 或可放在 25℃条件下水浴 5-15min。

③ 试剂一和二和三和四可按照 10:10:10:140 比例配成混合液(一枪加 170 μL 该混合液)(该

混合液用多少配多少，现配现用）。

④ 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， $\Delta A = A1 - A2$ 。	

注意：本操作流程适用于绝大多数常规样本检测，实验条件可根据实际样本状态适度微调；

针对特殊类型样本，我司技术支持可提供专属优化建议。

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， $6.22 \times 10^3 \text{ L} / \text{mol} / \text{cm}$ ；

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= $2 \times 10^{-4} \text{ L}$ ；

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。