Chloroplast 3-phosphoglycerate kinase activity assay kit

叶绿体 3-磷酸甘油酸激酶(PGK)试剂盒说明书

货号：BN72646| 方法：微板法 | 规格：96 样

一、产品简介：

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：

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液一	液体 100mL×1 瓶	4℃保存	
提取液二	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。
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。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μL×1 支	4℃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。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、叶绿体 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：

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、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 170μL 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，ΔA=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。

NADH-GPK(nmol/min/g 鲜重)=[ΔA÷(ε×d)×V2×10^9]÷(W×V1÷V)÷T=321.6×ΔA÷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 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

NADH-GPK(nmol/min/mg prot)=[ΔA÷(ε×d)×V2×10^9]÷(V1×Cpr) ÷T=321.6×ΔA÷Cpr

ε---NADH 摩尔消光系数，6.22×10^3 L / mol /cm；　　d---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；

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。