

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

注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。

货号：BC2250

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，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

| 试剂名称 | 规格 | 保存条件 |
|------|--------------|--------|
| 提取液 | 液体 60 mL×1 瓶 | 2-8℃保存 |
| 试剂一 | 液体 25 mL×1 瓶 | 2-8℃保存 |
| 试剂二 | 粉剂×1 支 | -20℃保存 |
| 试剂三 | 粉剂×1 支 | -20℃保存 |
| 试剂四 | 粉剂×1 瓶 | -20℃保存 |
| 试剂五 | 粉剂×3 瓶 | -20℃保存 |

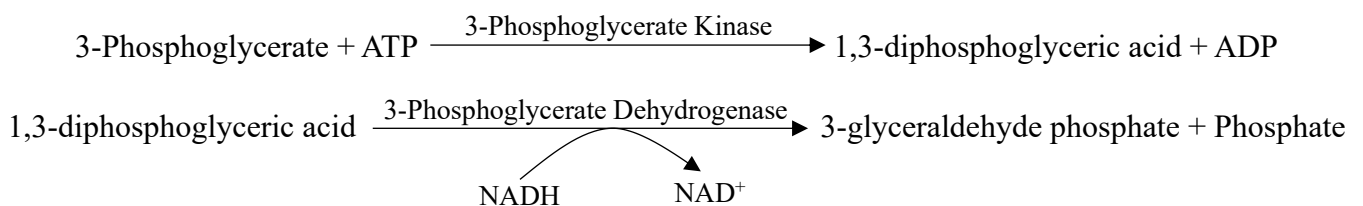
溶液的配制：

- 1、试剂二：临用前加入 1mL 蒸馏水充分溶解，用不完的试剂分装后-20℃保存 4 周，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℃保存 4 周，禁止反复冻融；
- 3、试剂四：临用前加入 3 mL 蒸馏水充分溶解，用不完的试剂分装后-20℃保存 4 周，禁止反复冻融；
- 4、试剂五：提供一空棕色试剂瓶。临用前取一支试剂五倒入空瓶中并加入 10 mL 蒸馏水充分溶解，用不完的试剂分装后-20℃保存 2 周，禁止反复冻融（该试剂为冻干试剂，可能存在肉眼观察试剂量相差较大甚至量很少的现象，此现象不影响使用，实际质量相同）；
- 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=1.14mL：1.5mL：0.06 mL：0.15 mL：0.15 mL：0.6 mL（共 3.6mL，4T）的比例配制，根据样本量配制，现用现配。

产品说明：

3-磷酸甘油酸激酶（Phosphoglycerate Kinase, PGK, EC.2.7.2.3）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/细胞超声破碎仪、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℃，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（浆）等液体：直接检测。若有浑浊则离心后取上清测定

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、工作液37℃预热10min。

3、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℃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。

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

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。

$$PGK (U/10^4 \text{ cell}) = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div (N \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 321.54 \times \Delta A \div N$$

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；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；N：细胞数量，以万计；10⁹：单位换算系数，1mol=10⁹nmol。

注意事项:

1. 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。
2. 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。
3. 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:
PGK (U/g 质量) = $321.54 \times \Delta A \div W \times \text{稀释倍数} = 321.54 \times 0.47 \div 0.1 \times 4 = 6044.952$ 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:
PGK (U/g 质量) = $321.54 \times \Delta A \div W \times \text{稀释倍数} = 321.54 \times 0.556 \div 0.1 \times 20 = 35755.248$ 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:
PGK (U/mL) = $321.54 \times \Delta A = 321.54 \times 0.057 = 18.328$ U/mL。

相关系列产品:

- BC2270/BC2275 果糖-1,6-二磷酸醛缩酶 (FBA) 活性检测试剂盒
- BC2240/BC2245 果糖-1,6-二磷酸 (FDP) 含量检测试剂盒
- BC0530/BC0530 果糖-6 磷酸激酶 (PFK) 活性检测试剂盒