

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