

3-磷酸甘油酸激酶 (3-Phosphoglycerate kinase, PGK)

试剂盒说明书

分光光度法 50 管/48 样

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义：

3-磷酸甘油酸激酶是糖酵解的关键酶，广泛存在于动植物和微生物体内，催化 1, 3-二磷酸甘油酸转变为 3-磷酸甘油酸，产生 1 分子 ATP，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。

测定原理：

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，340nm 处的吸光度变化反映了 3-磷酸甘油酸激酶的活性的高低。

组成：

产品名称	PSS014-50T/48S	Storage
提取液：液体	100ml	4°C
试剂一：液体	25ml	4°C避光
试剂二：粉剂	1 瓶	-20°C避光
试剂三：粉剂	1 瓶	-20°C避光
试剂四：粉剂	1 瓶	-20°C避光
试剂五：粉剂	1 瓶	-20°C避光
说明书	一份	

试剂二：粉剂×1 瓶，-20°C避光保存。临用前加 5ml 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。

试剂三：粉剂×1 瓶，-20°C避光保存。临用前加 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。

试剂四：粉剂×1 瓶，-20°C避光保存。临用前加 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。

试剂五：粉剂×1 瓶，-20°C避光保存。临用前加 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。



自备仪器和用品：

天平、低温离心机、研钵、紫外分光光度计、1 ml 石英比色皿。

酶液提取：

①**总 PGK 酶提取**：建议称取约 0.1g 样本，加入 1ml 提取液，冰浴匀浆后超声破碎（冰浴，200W，破碎 3s，间歇 7s，总时间 1min），然后 4℃，500g 离心 5min，取上清测定。

②**胞浆和叶绿体 PGK 酶分离**：按照植物组织质量（g）：提取液体积(ml)为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 样本，加入 1ml 提取液），冰浴匀浆后于 4℃，500g 离心 5min，弃沉淀，取上清在 4℃，8000g 离心 10min，取上清用于测定胞浆 PGK 酶活性，取沉淀加 1ml 提取液，震荡溶解后超声破碎（冰浴，200W，破碎 3s，间歇 7s，总时间 1min），然后 4℃，500g 离心 5min，取上清测定叶绿体中 PGK 酶活性。

建议测定总 PGK 酶活性，按照步骤①提取粗酶液，若需要分别测定胞浆和叶绿体中的 PGK，则按照步骤②提取粗酶液。

测定操作：

1. 分光光度计预热 30min，调节波长至 340nm，蒸馏水调零。
2. 取 1ml 石英比色皿，依次加入 500μl 试剂一，100μl 试剂二，50μl 试剂三，50μl 试剂四，200μl 试剂五，100μl 粗酶液，充分混匀，记录 340nm 处 10s 的吸光值 A1 和 310s 的吸光值 A2， $\Delta A=A1-A2$

计算公式：

(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 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{PGK (nmol/min/mg prot)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 321.54 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(2) 按照样本质量计算

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

$$\text{PGK (nmol/min/g 鲜重)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 321.54 \times \Delta A \div W$$

V 反总：反应体系总体积，1ml； ϵ ：NADH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$ ；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，5 min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/ml；W：样本质量，g

