

3-磷酸甘油酸激酶（PGK）活性检测试剂盒说明书

微量法

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：BC2255

规格：100T/96S

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 110 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 10 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 支	-20℃保存
试剂五	粉剂×2 瓶	-20℃保存

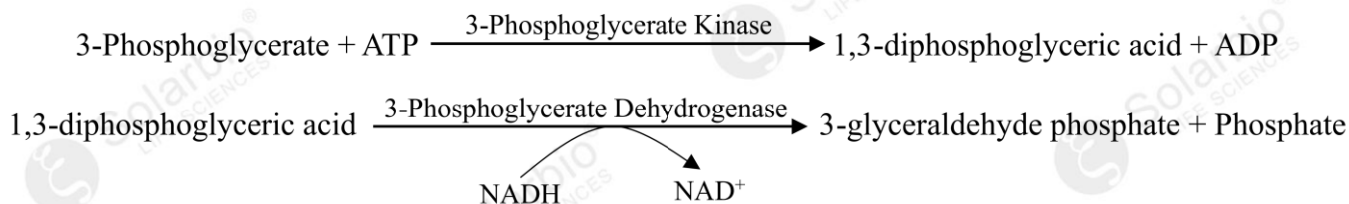
溶液的配制：

- 1、试剂二：临用前加入 0.5mL 蒸馏水充分溶解后待用，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 1 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 1 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 4 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，可能存在不同瓶间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=0.57mL：0.75mL：0.03mL：0.075 mL：0.075 mL：0.3 mL（共 1.8mL，10T）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。





需自备的仪器和用品:

紫外分光光度计/酶标仪、低温台式离心机、水浴锅、微量石英比色皿/96孔UV板、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/酶标仪预热30min 以上，调节波长至340nm，分光光度计蒸馏水调零。

2、工作液37℃预热10min。

3、样本测定：(在微量石英比色皿/96孔UV板中分别加入下列试剂)

试剂名称（μL）	空白管	测定管
工作液	180	180
样本	-	20
蒸馏水	20	-

在微量石英比色皿/96孔UV板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（酶标仪有控温功能可将温度调至37℃），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

A、按微量石英比色皿计算:

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。

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

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， 2×10^{-4} L； ϵ ：NADH 摩尔消光系数， 6.22×10^3 L/mol/cm；d：微量石英比色皿光径，1cm；V 样：加入样本体积，0.02mL；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； 10^9 ：单位换算系数， $1\text{mol}=10^9\text{nmol}$ 。

B、按 96 孔 UV 板计算：

将上述公式中的 d-1cm 改为 d-0.6cm（96 孔 UV 板光径）进行计算即可。

注意事项：

1. ΔA 大于 0.8 或者 A1 测定小于 0.9 时（96 孔 UV 板是当 ΔA 大于 0.5 或者 A1 测定小于 0.6 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，用微量石英比色皿测得计算 ΔA 测定管=A1 测定-A2 测定=1.05-0.5559=0.4941， ΔA 空白管=A1 空白-A2 空白=0.9966-0.9941=0.0025， $\Delta A=\Delta A$ 测定管- ΔA 空白管=0.4941-0.0025=0.4916，按样本质量计算酶活得：
 $\text{PGK (U/g 质量)} = 321.54 \times \Delta A \div W \times \text{稀释倍数} = 321.54 \times 0.4916 \div 0.1 \times 4 = 6322.7626 \text{ U/g 质量}$ 。
- 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，用微量石英比色皿测得计算， ΔA 测定管=A1 测定-A2 测定=0.9327-0.4518=0.4809， ΔA 空白管=A1 空白-A2 空白=0.9966-0.9941=0.0025， $\Delta A=\Delta A$ 测定管- ΔA 空白管=0.4809-0.0025=0.4784，按样本质量计算酶活得：
 $\text{PGK (U/g 质量)} = 321.54 \times \Delta A \div W \times \text{稀释倍数} = 321.54 \times 0.4784 \div 0.1 \times 20 = 30764.9472 \text{ U/g 质量}$ 。
- 3、取骆驼血清样本 100 μ L 按照测定步骤直接测定，用微量石英比色皿测得计算 ΔA 测定管=A1 测定-A2 测定=1.0435-0.9793=0.0642， ΔA 空白管=A1 空白-A2 空白=0.9966-0.9941=0.0025， $\Delta A=\Delta A$ 测定管- ΔA 空白管=0.0642-0.0025=0.0617，按液体体积计算酶活得：
 $\text{PGK (U/mL)} = 321.54 \times \Delta A = 321.54 \times 0.0617 = 19.8390 \text{ U/mL}$ 。

相关发表文献：

[1] Huang C, Zhang D, Wang Z, Zhao Y, Blecker C, Li S, Zheng X, Chen L. Validation of protein biological markers of lamb meat quality characteristics based on the different muscle types. Food Chem. 2023 Nov 30;427:136739. doi: 10.1016/j.foodchem.2023.136739. Epub 2023 Jun 26. PMID: 37392625.

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

