



3-磷酸甘油酸激酶活性检测试剂盒

PGK Assay Kit

微量法

产品编号: AK509M

产品规格: 100T/96S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
ES509	100mL×1 瓶	4℃保存;
AK509-A	10mL×1 瓶	4℃避光保存;
AK509-B	粉剂×1 瓶	-20℃避光保存。临用前加 2mL 蒸馏水充分溶解; 用不完的试剂分装后-20℃保存, 禁止反复冻融。
AK509-C	粉剂×1 支	-20℃避光保存。临用前加 1mL 蒸馏水充分溶解; 用不完的试剂分装后-20℃保存, 禁止反复冻融。
AK509-D	粉剂×1 支	-20℃避光保存。临用前加 1mL 蒸馏水充分溶解; 用不完的试剂分装后-20℃保存, 禁止反复冻融。
AK509-E	粉剂×1 瓶	-20℃避光保存; 临用前加 4 mL 蒸馏水充分溶解; 用不完的试剂分装后-20℃保存, 禁止反复冻融。

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介:

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

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。

自备用品:

紫外分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔板 (UV 板)、天平、低温离心机、研钵、冰和蒸馏水。

酶液提取

1. 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 ES509) 进行冰浴匀浆, 然后 10000g, 4℃, 离心 10min, 取上清置于冰上待测。
2. 细胞: 按照细胞数量 (10^4 个): 提取液体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 500 万细胞加入 1mL ES509), 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。
3. 血清/血浆: 直接检测, 若有浑浊则离心后取上清测定。

测定步骤:

1. 紫外分光光度计/酶标仪预热 30min, 调节波长至 340nm, 蒸馏水调零。
2. 取微量石英比色皿/96 孔板 (UV 板), 依次加入:

试剂名称	测定管 (ul)
AK509-A	100
AK509-B	20
AK509-C	10
AK509-D	10

AK509-E	40
粗酶液	20
充分混匀, 记录 340nm 处 10s 的吸光值 A1, 然后迅速置于 37°C 水浴或培养箱 5min, 拿出迅速擦干测定 310s 时的吸光值 A2, 计算 $\Delta A = A1 - A2$.	

计算公式:

a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

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。

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

2. 按照样本质量计算

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

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

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 10^4 个细胞每分钟消耗 1nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

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

注: $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, $2 \times 10^{-4} \text{L}$; ϵ : NADH 摩尔消光系数, $6.22 \times 10^3 \text{L/mol/cm}$; d : 比色皿光径, 1cm; $V_{\text{样}}$: 加入样本体积, 0.02mL; $V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积, 1mL; T : 反应时间, 5 min; C_{pr} : 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. 用 96 孔板测定的计算公式如下

将上述公式中的 $d=1\text{cm}$ 改为 $d=0.5\text{cm}$ (96 孔板) 进行计算即可。