

3-磷酸甘油酸激酶(PGK) 活性检测试剂盒 (微量法) (本试剂盒仅供科研使用)

产品包装

| 产品编号 | 产品名称 | 产品规格 |
|---------|------------------------|------------|
| YFX0393 | 3-磷酸甘油酸激酶(PGK) 活性检测试剂盒 | 100 管/96 样 |

产品内容

| 名称 | 规格 | 储存条件 |
|-----|---------------------------|-----------|
| 提取液 | 液体 100mL ×1 瓶 | 4°C |
| 试剂一 | 液体 10mL ×1 瓶 | 4°C, 避光 |
| 试剂二 | 粉剂×1 瓶: 临用前加 2mL 蒸馏水充分溶解。 | -20°C, 避光 |
| 试剂三 | 粉剂×1 瓶: 临用前加 1mL 蒸馏水充分溶解。 | -20°C, 避光 |
| 试剂四 | 粉剂×1 瓶: 临用前加 1mL 蒸馏水充分溶解。 | -20°C, 避光 |
| 试剂五 | 粉剂×1 瓶: 临用前加 2mL 蒸馏水充分溶解。 | -20°C, 避光 |

一、产品说明

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。

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。

二、自备材料

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

三、样本准备:

- 1、组织: 按照质量 (g): 提取液体积(mL)为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g, 加入 1mL 提取液) 加入提取液, 冰浴匀浆后于 4°C, 10000g 离心 10min, 取上清置冰上待测。
- 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 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 4°C, 10000g 离心 10min, 取上清置冰上待测。
- 3、液体: 直接检测。

四、操作步骤

正式测定前, 必需取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

- 1、分光光度计或酶标仪预热 30min 以上, 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 100 μ L 试剂一, 20 μ L 试剂二, 10 μ L 试剂三, 10 μ L 试剂四, 40 μ L 试剂五, 20 μ L 粗酶液, 充分混匀, 记录 340nm 处 10s 的吸光值 A1 和 310s 的吸光值 A2, $\Delta A=A1-A2$ 。

五、活性的计算

A. 用微量石英比色皿测定的计算公式

1、按照样本鲜重计算:

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。

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

2、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。

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

3、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。

$$PGK (\text{nmol/min}/10^4\text{cell}) = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{细胞数量} \div V_{\text{样总}}) \div T = 321.54 \times \Delta A \div \text{细胞数量}。$$

4、按照液体体积计算:

酶活单位定义: 每毫升液体每分钟消耗1nmol的NADH定义为一个酶活力单位。

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

V 反总: 反应体系总体积, 0.2mL; ϵ : NADH 摩尔消光系数, 6.22×10^3 L/mol/cm;
d: 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, 5 min; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量, g。

B. 用 96 孔板测定的计算公式

1、按照样本鲜重计算:

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。

$$PGK (\text{nmol/min/g}) = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 643.08 \times \Delta A \div W。$$

2、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。

$$PGK (\text{nmol/min/mg prot}) = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 643.08 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}。$$

3、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。

$$PGK (\text{nmol/min}/10^4\text{cell}) = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{细胞数量} \div V_{\text{样总}}) \div T = 643.08 \times \Delta A \div \text{细胞数量}。$$

4、按照液体体积计算:

酶活单位定义: 每毫升液体每分钟消耗1nmol的NADH定义为一个酶活力单位。

$$PGK (\text{nmol/min/mL}) = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T = 643.08 \times \Delta A。$$

V 反总: 反应体系总体积, 0.2mL; ϵ : NADH 摩尔消光系数, 6.22×10^3 L/mol/cm;
d: 比色皿光径, 0.5cm; 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, 5 min; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量, g。

六、注意事项

配制好的试剂二、试剂三、试剂四、试剂五 3 天内使用完。