

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

试剂盒说明书

微量法100T/96S

注意：正式测定之前选择2-3个预期差异大的样本做预测定。

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。

自备实验用品及仪器

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。

试剂组成和配制

提取液：液体100mL×2瓶，4℃保存。

试剂一：液体10mL×1瓶，4℃避光保存。

试剂二：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。

试剂三：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。

试剂四：粉剂×1支，-20℃避光保存。临用前加1 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。

试剂五：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。

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酶的分离：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/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，依次加入100μL试剂一，20μL试剂二，10μL试剂三，10μL试剂四，40μL试剂五，20μL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

- 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。

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

(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。

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

V反总：反应体系总体积，0.2mL； 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，0.02mL；

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。

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

(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。

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

V反总：反应体系总体积，0.2mL； ϵ ：NADH摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3 \text{ L / mol /cm}$ ；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