

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 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, $\Delta A=A1-A2$

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。

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

(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。

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

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。

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

(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。

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

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