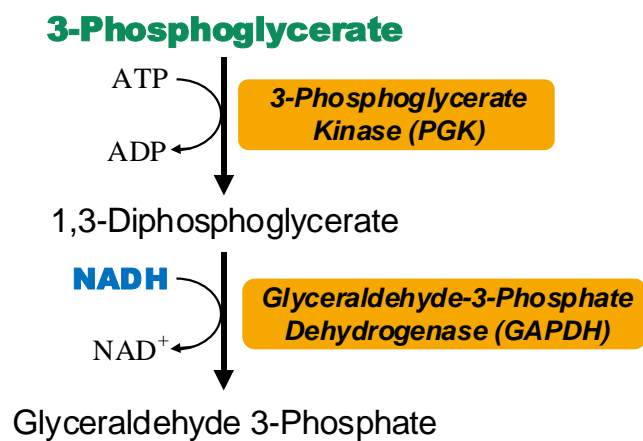




3-磷酸甘油酸激酶 (PGK) 活性检测试剂盒
3-Phosphoglycerate Kinase (PGK) Activity Assay Kit



北京盒子生工科技有限公司
Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.



3-磷酸甘油酸激酶 (PGK) 活性检测试剂盒

3-Phosphoglycerate Kinase (PGK) Activity Assay Kit

一、产品描述

3-磷酸甘油酸激酶 (PGK) 能够催化 3-磷酸甘油酸生成 1,3-二磷酸甘油酸, 是糖酵解途径的关键酶, 并具有影响 DNA 复制和修补及刺激病毒 RNA 合成等生物学功能, 在生物体糖、脂和蛋白代谢紊乱疾病中发挥着重要作用。

3-磷酸甘油酸激酶 (PGK) 能够催化 3-磷酸甘油酸和 ATP 生成 1,3-二磷酸甘油酸, 3-磷酸甘油醛脱氢酶逆向催化 1,3-二磷酸甘油酸和 NADH 生成 3-磷酸甘油醛、无机磷和 NAD⁺, NADH 在 340 nm 处具有特征吸收峰, 通过吸光值变化即可表征 3-磷酸甘油醛脱氢酶的活性。

二、产品内容

名称	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液	液体 110 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂一	液体 10 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂二	粉剂×1 支	-20°C 保存	使用前加入 0.5 mL 蒸馏水充分溶解 (分装后-20°C可保存 1 个月, 避免反复冻融)
试剂三	粉剂×1 支	-20°C 保存	使用前加入 1 mL 蒸馏水充分溶解 (分装后-20°C可保存 1 个月, 避免反复冻融)
试剂四	粉剂×1 支	-20°C 保存	使用前加入 1 mL 蒸馏水充分溶解 (分装后-20°C可保存 1 个月, 避免反复冻融)
试剂五	粉剂×2 瓶	-20°C 保存	使用前加入 4 mL 蒸馏水充分溶解 (分装后-20°C可保存 2 周, 避免反复冻融)
PGK 工作液的制备 (现用现配): 使用前根据使用量按试剂一: 试剂二: 试剂三: 试剂四: 试剂五: H ₂ O = 25:1:2.5:2.5:10:19 的体积比配置, 充分混匀即为 PGK 工作液。			

三、产品使用说明

测定过程中所需要的仪器和试剂: 紫外分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿 (光径 10 mm) /96 孔 UV 板、研钵/匀浆器、可调式移液器/多道移液器、台式离心机、恒温水浴/培养箱和蒸馏水。

1.粗酶液的制备（可根据预实验结果适当调整样本量及比例）

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 0.1 g 组织，加入 1 mL 提取液）处理样品，冰浴匀浆，4°C 12000 g 离心 10 min，取上清置于冰上待测。

②细菌或细胞：离心收集细菌或细胞至离心管内，按照细菌或细胞数量（ 10^4 个）：提取液体积（mL）为（500-1000）：1 的比例（建议 500 万细菌或细胞加入 1 mL 提取液）处理样品，冰浴超声破碎（功率 300 W，超声 3 s，间隔 7 s，总时间 3 min），4°C 12000 g 离心 10 min，取上清置于冰上待测。

③液体样本：直接检测或适当稀释后再进行检测。

2.测定步骤

①紫外分光光度计或酶标仪预热 30 min 以上，调节波长至 340 nm，蒸馏水调零。

②在 96 孔 UV 板或微量石英比色皿中依次加入下列试剂：

试剂	测定组 (μL)	空白组 (μL)
粗酶液	20	-
蒸馏水	-	20
PGK 工作液	180	180

吸光值测定：①充分混匀并立即开始计时，测定 10 s（总时间）时 340 nm 处吸光值，记为 A1 测定和 A1 空白；②37°C（哺乳动物）或 25°C（其他物种）准确反应 300 s，测定 310 s（总时间）时 340 nm 处吸光值，记为 A2 测定和 A2 空白；③计算 ΔA 测定=A1 测定-A2 测定， ΔA 空白=A1 空白-A2 空白， $\Delta A = \Delta A$ 测定- ΔA 空白。注：空白组只需测定 1-2 次。

3.3-磷酸甘油酸激酶（PGK）活性计算

3.1 使用 96 孔 UV 板测定的计算公式

①按组织蛋白浓度计算

单位定义：每 mg 组织蛋白每分钟消耗 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{PGK (U/mg prot)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times 10^9}{\epsilon \times d_1 \times C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{643.09 \times \Delta A}{C_{\text{pr}}}$$

②按组织样本质量计算

单位定义：每 g 组织每分钟消耗 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{PGK (U/g)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{样总}} \times 10^9}{\epsilon \times d_1 \times W \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{643.09 \times \Delta A}{W}$$

③按细菌或细胞数量计算

单位定义：每 10^4 个细菌或细胞每分钟消耗 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{PGK (U/10}^4 \text{ cell)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{样总}} \times 10^9}{\epsilon \times d_1 \times \text{细菌或细胞数量} \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{643.09 \times \Delta A}{\text{细菌或细胞数量}}$$

④按液体样本体积计算

单位定义：每 mL 液体样本每分钟消耗 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{PGK (U/mL)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times 10^9}{\epsilon \times d_1 \times \text{样} \times T} = 643.09 \times \Delta A$$

3.2 使用微量石英比色皿测定的计算公式

将上述公式中96孔UV板光径 $d_1=0.5$ cm, 改为微量石英比色皿光径 $d_2=1.0$ cm进行计算即可。

注释： V样：反应体系中加入粗酶液的体积，0.02 mL；V样总：粗酶液总体积，1 mL；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_1 ：96孔UV板光径，0.5 cm； d_2 ：微量石英比色皿光径，1 cm；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；W：样本质量，g；T：反应时间：300 s=5 min；细菌或细胞数量：以万计； 10^9 ：单位换算系数，1 mol= 10^9 nmol。

四、注意事项

- ①若 A1 测定小于 0.9 或 ΔA 大于 0.8 时，建议将粗酶液使用提取液适当稀释后再进行测定；
- ②准确在 10 和 310s 处完成吸光值测定，以确保实验结果的准确性和重复性；若使用 96 孔 UV 板测定应使用多道移液器且分批测定，以确保组间反应时间一致；
- ③提取液中含有约 1 mg/mL 蛋白含量，测定样本蛋白含量时需扣除提取液自身的蛋白含量；
- ④为保证结果准确且避免试剂损失，测定前请仔细阅读说明书（以实际收到说明书内容为准），确认试剂储存和准备是否充分，操作步骤是否清楚，且务必取 2-3 个预期差异较大的样本进行预测定，过程中问题请您及时与工作人员联系。

For Research Use Only. Not for Use in Diagnostic Procedures.

boxbio

Manufactured and Distributed by

Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.
Liandong U Valley, Tongzhou District, Beijing, China

TEL: 400-805-8228

E-MAIL: techsupport@boxbio.cn

Copyright © 2020 Boxbio, All Rights Reserved.

