

上海茁彩生物科技有限公司  
Shanghai zcibio technology Co., Ltd.



生化检测原理示意图

## 3-磷酸甘油酸激酶（PGK）试剂盒说明书

### 微量法

**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（UV 板）。

#### 试剂组成和配制

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液	液体 100mL×1 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
试剂三	粉剂×1 支	-20℃避光保存	临用前加 1mL 蒸馏水充分溶解
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
试剂五	粉剂×1 瓶	-20℃避光保存	临用前加 2 mL 蒸馏水充分溶解

#### 酶液提取

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℃，10000g 离心10min，取上清置冰上待测。
2. 细胞：按照细胞数量（10<sup>4</sup>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℃，10000g 离心10min，取上清置冰上待测。
3. 液体：直接检测。

#### 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（UV 板），依次加入100 μL试剂一，20 μL试剂二，10 μL试剂三，10 μL试剂四，40 μL试剂五，20 μL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。

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

#### (2) 按照样本质量计算

酶活单位定义：每克组织每分钟消耗1nmol的NADH定义为一个酶活力单位。

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

#### (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。

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

#### (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。

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

V 反总：反应体系总体积，0.2mL； $\epsilon$ ：NADH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3$  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1nmol的NADH定义为一个酶活力单位。

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

#### (2) 按照样本质量计算

酶活单位定义：每克组织每分钟消耗1nmol的NADH定义为一个酶活力单位。

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

#### (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。

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

#### (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。

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

V 反总：反应体系总体积，0.2mL； $\epsilon$ ：NADH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3$  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

## 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。