

3-磷酸甘油酸激酶(PGK)检测试剂盒 (NADH 速率法/微量法)

货号: PMK1127

保存: -20°C 避光保存 12 个月

规格: 48T/96T

适用样本: 动植物组织、细胞、细菌

产品简介

3-磷酸甘油酸激酶 (3-Phosphoglycerate kinase, PGK, EC. 2.7.2.3) 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。本试剂盒提供了一种简单的检测方法, 用于检测生物样本中 3-磷酸甘油酸激酶 (PGK) 活性。其原理是 3-磷酸甘油酸激酶 (PGK) 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, NADH 在 340nm 处有特征吸收峰而 NAD 没有, 测定 340nm 处吸光度的变化可反映了 PGK 的活性的高低。

产品内容

试剂盒组分	规格		储存条件
	48T	96T	
提取液	50mL	100mL	4°C, 保存
试剂一	7mL	14mL	4°C, 保存
试剂二	粉剂×1 瓶	粉剂×1 瓶	-20°C, 避光保存
试剂三	粉剂×1 支	粉剂×1 支	-20°C, 避光保存
试剂四	粉剂×1 支	粉剂×1 支	-20°C, 避光保存
试剂五	50μL	100μL	-20°C, 避光保存

自备耗材

酶标仪或紫外分光光度计 (能测 340nm 处的吸光度) 及恒温培养箱

96 孔 UV 板或微量石英比色皿、移液枪及枪头

去离子水

匀浆器 (如果是组织样本)

试剂准备

注意: 各组分 (小管试剂) 开盖前, 请先低速离心。

提取液: 即用型; 使用前, 平衡到室温; 4°C 保存。

试剂一: 即用型; 使用前, 平衡到室温; 4°C 保存。

试剂二: 临用前配制, 96T 加入 2mL 去离子水, 48T 加入 1mL 去离子水, 充分溶解。未用完的已溶解的试剂二分装后 -20°C 保存, 避免反复冻融。

试剂三: 临用前配制, 96T 加入 1mL 去离子水, 48T 加入 0.5mL 去离子水, 充分溶解。未用完的已溶解的试剂三分装后 -20°C 保存, 避免反复冻融。

试剂四: 临用前配制, 96T 加入 1mL 去离子水, 48T 加入 0.5mL 去离子水, 充分溶解。未用完的已溶解的试剂四分装后 -20°C 保存, 避免反复冻融。

产品说明书

试剂五：使用时，用去离子水进行 1:20 稀释，整个实验过程中，冰上避光放置。现用现配，用多少配多少；分装-20℃保存，避免反复冻融。

工作液：每孔准备 180μL 工作液，现配现用：吸 130 μL 试剂一，20 μL 试剂二，10 μL 试剂三，10 μL 试剂四，10 μL 试剂五混合均匀。

样本制备

1. 组织：称取约 0.1g 样本，加入 1mL 提取液，冰浴匀浆，10,000g，4℃离心 10min，取上清液置冰上待测。
2. 细胞或细菌：收集 500 万细胞或细菌到离心管内，用冷 PBS 清洗细胞，离心后弃上清，加入 1mL 提取液，冰浴超声波破碎细胞或细菌 5min（功率 20%或 200W，超声 3s，间隔 7s，重复 30 次），然后 10,000g，4℃离心 10min，取上清液，置冰上待测。

注意：推荐使用新鲜样本，如果不立即进行实验，样本可在-80℃保存 1 个月。如需测定蛋白浓度，推荐使用 Bradford 法蛋白质定量试剂盒进行样本蛋白质浓度测定。

实验步骤

1. 酶标仪或紫外分光光度计预热 30min 以上，调节波长到 340nm，紫外分光光度计去离子水调零。
2. 样本测定：在 96 孔 UV 板或微量石英比色皿中依次加入 20μL 样本和 180μL 工作液充分混匀，记录 340nm 处 10s 的吸光值 A_1 和 310s 的吸光值 A_2 ，计算 $\Delta A = A_1 - A_2$ 。

注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果 ΔA 小于 0.001 可适当加大样本量。如果 ΔA 大于 0.8，样本可用提取液进一步稀释，计算结果乘以稀释倍数，或减少提取用样本量。

结果计算

A. 使用 96 孔 UV 板测定的计算公式

1. 按样本鲜重计算

单位的定义：每 g 组织在反应体系中每分钟消耗 1nmolNADH 定义为一个酶活力单位。

$$PGK(U/g \text{ 鲜重}) = [\Delta A \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T = 643 \times \Delta A \div W \times n$$

2. 按样本蛋白浓度计算：

单位的定义：每 mg 组织蛋白在反应体系中每分钟消耗 1nmolNADH 定义为一个酶活力单位。

$$PGK(U/mg \text{ prot}) = [\Delta A \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (Cpr \times V_{\text{样}}) \div T = 643 \times \Delta A \div Cpr \times n$$

3. 按细菌或细胞密度计算

单位的定义：每 1 万个细菌或细胞在反应体系中每分钟消耗 1nmolNADH 定义为一个酶活力单位。

$$PGK(U/10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times 500) \div T = 1.286 \times \Delta A \times n$$

$V_{\text{反应}}$ ：反应体系总体积， 2.0×10^{-4} L； ϵ ：NADH 摩尔消光系数， 6.22×10^3 mol/L/cm； d ：96 孔板光径，0.5cm； 10^9 ：1mol=1×10⁹nmol； $V_{\text{样}}$ ：加入样本体积，0.02mL； $V_{\text{样总}}$ ：加入提取液体积，1mL； W ：样品质量，g； T ：反应时间，5min； n ：样本稀释倍数； Cpr ：样本蛋白质浓度，mg/mL；500：细菌或细胞总数，500 万。

B. 使用微量石英比色皿测定的计算公式

将上述计算公式中的光径 d :0.5cm 调整为 d :1cm 进行计算即可。

注意事项

1. 实验过程中请穿戴实验服、口罩和乳胶手套。请按照生物实验室的国家安全规定进行实验，尤其是在检测血样或其他体液时。
2. 本试剂盒仅用于实验室科学研究，如果本试剂盒用于临床诊断或任何其他用途，我们将不对任何后果负责。
3. 本试剂盒应在有效期内使用，并请严格按照说明书进行存储。
4. 不同批次号、不同厂家之间的组分不要混用；否则，可能导致结果异常。
5. 勤换吸头，避免各组分之间的交叉污染。

相关产品：

PMK1120 己糖激酶 (HK) 检测试剂盒 (微量法)

PMK1121 丙酮酸激酶 (PK) 检测试剂盒 (微量法)

PMK1122 磷酸果糖激酶 (PFK) /6-磷酸果糖激酶/果糖-6-磷酸激酶检测试剂盒

更多产品详情了解，请关注公众号：

