

3-磷酸甘油酸激酶(PGK)检测试剂盒（定磷法/微量法）

货号：PMK1924

保存：-20℃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 Pi，通过测定 Pi 增加速率来测定 PGK 活性。

产品内容

试剂盒组分	规格		储存条件
	48T	96T	
提取液	50mL	100mL	4℃，保存
试剂一	7mL	14mL	4℃，保存
试剂二	粉剂×1 瓶	粉剂×1 瓶	-20℃，避光保存
试剂三	粉剂×1 支	粉剂×1 支	-20℃，避光保存
试剂四	粉剂×1 支	粉剂×1 支	-20℃，避光保存
试剂五	50μL	100μL	-20℃，避光保存
试剂六	粉剂×1 瓶	粉剂×1 瓶	4℃避光保存
试剂七	粉剂×1 瓶	粉剂×1 瓶	4℃避光保存
试剂八	粉剂×1 瓶	粉剂×1 瓶	4℃避光保存
试剂九	5mL	10mL	室温保存
标准品	1mL	1mL	4℃避光保存

自备耗材

酶标仪或分光光度计（能测 660nm 处的吸光度）及恒温箱
 96 孔板或微量玻璃比色皿、可调节式移液枪及枪头
 制冰机、低温离心机
 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℃保存。

产品说明书

试剂一：即用型；使用前，平衡到室温；4℃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℃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℃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℃保存，避免反复冻融。

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130μL试剂一，20μL试剂二，10μL试剂三，10μL试剂四，10μL试剂五混合均匀。

试剂六：临用前配制，48T加入2mL去离子水充分溶解，96T加入4mL去离子水充分溶解后使用。

试剂七：临用前配制，48T加入5mL去离子水充分溶解，96T加入10mL去离子水充分溶解后使用。

试剂八：临用前配制，48T加入5mL去离子水充分溶解，96T加入10mL去离子水充分溶解后使用。

试剂九：即用型；室温保存。

定磷试剂的配制：配制比例按照H₂O：试剂七：试剂八：试剂九=2:1:1:1的比例配制，配好的定磷试剂应为浅黄色。若无色则试剂失效，若是蓝色则为磷污染（请根据需要，用多少配多少）。

注意：配试剂最好用新的玻璃器皿或者一次性塑料器皿，以避免磷污染。

标准曲线设置：按下表所示用去离子水将10mM标准品稀释为1、0.5、0.25、0.125、0.0625、0.0313、0.0156 mM的标准溶液。

	标准品体积 (μL)	去离子水体积 (μL)	标准品浓度 (mM)
Std. 1	100μL 10mM	900	1
Std. 2	100μL of Std. 1 (1mM)	100	0.5
Std. 3	100μL of Std. 2 (0.5mM)	100	0.25
Std. 4	100μL of Std. 3 (0.25mM)	100	0.125
Std. 5	100μL of Std. 4 (0.125mM)	100	0.0625
Std. 6	100μL of Std. 5 (0.0625mM)	100	0.0313
Std. 7	100μL of Std. 6 (0.0313mM)	100	0.0156

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. 酶标仪或可见分光光度计预热30min以上，调节波长到660nm，可见分光光度计去离子水调零。
2. 酶促反应（在EP管中依次加入下列试剂）：

	空白管 (μL)	标准管 (μL)	测定管 (μL)	对照管 (μL)
工作液	0	0	180	180
样本	0	0	20	0

混匀后盖紧，37℃（哺乳动物）或25℃（其它物种）准确孵育10min

产品说明书

试剂六	0	0	20	20
样本	0	0	0	20

混匀后，室温（25℃左右），4,000g，离心 10min，取上清液；

3. 定磷(在 96 孔板或微量玻璃比色皿中加入下列试剂)

上清	0	0	40	40
不同浓度标准品	0	40	0	0
去离子水	40	0	0	0
定磷试剂	200	200	200	200

混匀，室温静置 10min 后，测定 660nm 吸光值。计算 $\Delta A_{\text{测}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ ， $\Delta A_{\text{标}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$ 。（空白和标准曲线只需做 1 次）

4. 注意：为保证实验结果的准确性，需先取 1-2 个样做预实验，如果测定的吸光值小于 0.005，可加大样本量，再测；如果测定的吸光值过高（高于 0.8）可用试剂二稀释样本后再测定，计算结果时注意乘以稀释倍数。

结果计算

1. 标准曲线的绘制

以标准液浓度为 y 轴， $\Delta A_{\text{标}}$ 为 x 轴，绘制标准曲线（浓度为 y 轴更方便计算结果）。

2. 无机磷 (Pi) 含量的计算

将 $\Delta A_{\text{测}}$ 带入方程得到 y 值 (mM)。

3. PGK 活性计算

(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产生 1nmol 无机磷定义为一个酶活性单位

$$\text{PGK 活性 (U/g 鲜重)} = (y \times V_{\text{酶促}} \times 10^6) \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T = 1000 \times y \div W$$

(2) 按细胞或细菌数量计算

单位的定义：每 1 万个细胞或细菌在反应体系中每分钟产生 1nmol 无机磷定义为一个酶活性单位

$$\text{PGK 活性 (U/10}^4 \text{ cell)} = (y \times V_{\text{酶促}} \times 10^6) \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times 500) \div T = 2 \times y$$

(3) 按样本蛋白浓度计算

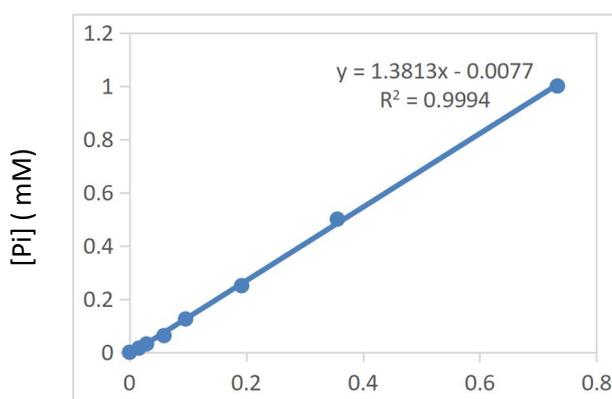
单位的定义：每 mg 组织蛋白在反应体系中每分钟产生 1nmol 无机磷定义为一个酶活性单位

$$\text{PGK 活性 (U/mg prot)} = (y \times V_{\text{酶促}} \times 10^6) \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T = 1000 \times y \div C_{\text{pr}}$$

$V_{\text{酶促}}$ ：酶促反应体系总体积， 2×10^{-4} L； 10^6 ：单位换算系数， $1\text{mmol} = 10^6\text{nmol}$ ； $V_{\text{样}}$ ：加入样本体积，0.02mL； $V_{\text{样总}}$ ：加入提取液体积，1mL；T：反应时间，10min；W：样本重量，g；500：细胞总数，500 万； C_{pr} ：样本蛋白浓度，mg/mL。

结果展示

典型标准曲线-以下数据和曲线仅供参考，实验者需根据自己的实验建立标准曲线。



$\Delta A_{\text{标}}$

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（微量法）

更多产品详情了解，请关注公众号：

