



3-磷酸甘油酸激酶（3-PGK）活性检测试剂盒说明书

紫外分光光度法

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、1 mL 石英比色皿。

试剂组成和配制

提取液：液体50mL×1 瓶，4℃保存。

试剂一：液体25mL×1 瓶，4℃避光保存。

试剂二：粉剂×1 瓶，-20℃避光保存。临用前加5mL蒸馏水充分溶解。

试剂三：粉剂×1 瓶，-20℃避光保存。临用前加2.5mL蒸馏水充分溶解。

试剂四：粉剂×1 瓶，-20℃避光保存。临用前加2.5mL蒸馏水充分溶解。

试剂五：粉剂×1 瓶，-20℃避光保存。临用前加10mL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（10⁴ 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. 分光光度计预热30min，调节波长至340nm，蒸馏水调零。
2. 取1mL石英比色皿，依次加入500 μL试剂一，100 μL试剂二，50 μL试剂三，50 μL试剂四，200 μL试剂五，100 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

- (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。

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

(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。

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

(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1 nmol的NADH定义为一个酶活力单位。

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

(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1 nmol的NADH定义为一个酶活力单位。

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

$V_{\text{反总}}$ ：反应体系总体积，1mL； ϵ ：NADH 摩尔消光系数， 6.22×10^3 L/mol/cm； d ：比色皿光径，1cm； $V_{\text{样}}$ ：加入样本体积，0.1mL； $V_{\text{样总}}$ ：加入提取液体积，1mL； T ：反应时间，5 min； C_{pr} ：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。