

3-磷酸甘油酸激酶 (PGK) 检测试剂盒 (UV板,微量法)

产品货号: BA1004

产品规格: 100管/96样

产品简介

3-磷酸甘油酸激酶是糖酵解的关键酶,也是生物得以生存的关键酶。广泛存在于动植物和微生物体内,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。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,引起340nm处的吸光度下降,即反映了3-磷酸甘油酸激酶的活性的高低。

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。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

产品内容:

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体120mL×1瓶	4℃
试剂一	液体10mL×1瓶	4℃
试剂二	粉剂×1瓶	-20℃
试剂三	粉剂×1支	-20℃
试剂四	粉剂×1支	-20℃
试剂五	粉剂×1瓶	-20℃

溶液的配制:

1. 试剂二:临用前加入2.5mL蒸馏水充分溶解后待用,用不完的试剂分装后-20℃保存,禁止反复冻融;
2. 试剂三:临用前加入1mL蒸馏水充分溶解,用不完的试剂分装后-20℃保存,禁止反复冻融;
3. 试剂四:临用前加入1mL蒸馏水充分溶解,用不完的试剂分装后-20℃保存,禁止反复冻融;
4. 试剂五:粉剂置于试剂瓶内棕色管中。临用前加入4mL蒸馏水充分溶解,用不完的试剂分装后-20℃保存,禁止反复冻融;
5. 工作液的配制:按照蒸馏水:试剂一:试剂二:试剂三:试剂四:试剂五=6:10:2:1:1:4的体积比例充分混匀,现用现配。

需自备的仪器和用品:

紫外分光光度计/酶标仪、低温台式离心机、水浴锅、微量石英比色皿/96孔UV板、可调式移液枪、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水。

操作步骤 (仅供参考):

一、样本处理 (可适当调整待测样本量,具体比例可以参考文献)

组织:按照组织质量(g):提取液体积(mL)为1:5~10的比例(建议称取约0.1g组织,加入1mL提取液)进行冰浴匀浆,然后10000g,4℃,离心10min,取上清置于冰上待测。

细胞:按照细胞数量(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10000g,4℃,离心10min,取上清置于冰上待测。血清/血浆:直接检测。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址:上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话:400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

二、测定步骤

- 分光光度计/酶标仪预热30min以上，调节波长至340nm，蒸馏水调零。
- 样本测定：(在微量石英比色皿/96孔UV板中分别加入下列试剂)

试剂名称 (μL)	空白管	测定管
工作液	180	180
样本	-	20
蒸馏水	20	-

在微量石英比色皿/96孔UV板中分别加入上述试剂，充分混匀后于340nm处测定10s时的吸光值A1，迅速置于37℃（哺乳动物）或25℃（其他物种）水浴或培养箱5min（酶标仪有控温功能可将温度调至37℃或25℃），拿出迅速擦干测定310s时的吸光值A2，计算ΔA测定管=A1测定-A2测定，ΔA空白管=A1空白-A2空白，ΔA=ΔA测定管-ΔA空白管。（空白管只需做1-2次）。

三、PCK活性计算

A、按微量石英比色皿计算：

- 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。

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

$$= 321.54 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

- 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。

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

$$= 321.54 \times \Delta A \div W$$

- 按照液体体积计算

酶活单位定义：每mL血清（浆）每分钟消耗1nmol的NADH定义为一个酶活力单位。

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

$$= 321.54 \times \Delta A \div W$$

- 按照细胞数量计算

酶活单位定义：每10⁴个细胞每分钟消耗1nmol的NADH定义为一个酶活力单位。

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

$$= 0.643 \times \Delta A$$

V反总：反应体系总体积，2×10⁻⁴L；ε：NADH摩尔消光系数，6.22×10³L/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，5min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；500：500万个细胞；10⁹：单位换算系数，1mol=10⁹nmol。

B、按96孔UV板计算：

将上述公式中的d-1cm改为d-0.6cm（96孔UV板光径）进行计算即可。

注意事项：

- ΔA大于0.8或者A1测定小于0.9时（96孔UV板是当ΔA大于0.5或者A1测定小于0.6时），建议将粗酶液用提取液稀释后再进行测定。当ΔA小于0.01时，可以延长反应时间（10min或15min）或增加样本体积来测定。
- 空白管为检测各试剂组分质量的检测孔，正常情况下，变化不超过0.01。
- 样本的蛋白浓度需自行测定，由于提取液中含有一定浓度的蛋白（约1mg/mL），所以测定样本蛋白浓度时需扣除提取液自身蛋白浓度。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

QQ：807961520

邮箱：saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com