

叶绿体 3-磷酸甘油酸激酶(PGK)试剂盒说明书

(货号: G0612F 分光法 48 样)

一、产品简介:

叶绿体 3-磷酸甘油酸激酶(PGK)是卡尔文循环中的关键酶, 催化 3-磷酸甘油酸和 ATP 反应产生 1,3-二磷酸甘油酸, 后者在 3-磷酸甘油醛脱氢酶和 NADH 作用下产生 3-磷酸甘油醛和 NAD⁺, 通过测定 NADH 的下降量, 进而得到 3-磷酸甘油酸激酶的活性大小。

二、试剂盒的组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液一	液体 50mL×1 瓶	4℃保存	
提取液二	液体 50mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉剂 mg×1 支	-20℃保存	用前甩几下或离心使试剂落入底部, 再加 2.2mL 蒸馏水溶解备用。
试剂二	粉剂 mg×3 支	4℃保存	用前取一支甩几下或离心使试剂落入底部, 再加 0.4mL 蒸馏水溶解备用。用不完的试剂分装后-20℃保存, 禁止反复冻融, 三天内用完。
试剂三	液体 μL×1 支	-20℃保存	用前甩几下或离心使试剂落入底部, 再加 1.1mL 蒸馏水溶解备用。可-20℃分装冻存。
试剂四	液体 35mL×1 瓶	4℃保存	
试剂五	液体 1.1mL×1 支	4℃保存	

三、所需的仪器和用品:

紫外分光光度计、1mL 石英比色皿 (光径 1cm)、可调式移液器、水浴锅、天平、震荡仪、低温离心机、研钵。

三、叶绿体 3-磷酸甘油酸激酶 (PGK) 活性测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

1、样本制备:

称取约 0.1g 植物组织样本, 加入 1mL 提取液一, 快速冰浴匀浆后于 4℃, 1600rpm 离心 5min, 弃沉淀, 取上清再 4℃, 5000rpm 离心 15min, 弃上清留沉淀, 向沉淀中加 1mL 提取液二, 强力涡旋震荡 15s, 置于冰上(或冰箱)在 4℃孵育 15min, 4℃, 13000rpm 离心 5min, 取上清测定叶绿体中 3-磷酸甘油酸激酶(PGK)的酶活性。提示: 整个叶绿体的提取过程须保持 4℃低温环境。

【注】: 若增加样本量, 可按照组织质量 (g): 提取液体积(mL)为 1: 5~10 的比例进行提取。

2、上机检测:

- ① 紫外分光光度计预热 30min, 调节波长至 340nm, 设定温度 25℃, 蒸馏水调零。
- ② 所有试剂解冻至室温 (25℃), 或可放在 25℃条件下水浴 5-15min。
- ③ 试剂一和二和三和四可按照 40:20:20:600 比例配成混合液 (一枪加 680μL 该混合液) (该混合液用多少配多少, 现配现用)。

④ 在 1mL 石英比色皿（光径 1cm）中依次加入：

试剂名称（μL）	测定管
样本	80
试剂一	40
试剂二	20
试剂三	20
试剂四	600
混匀，室温（25℃）条件下，孵育 10min	
试剂五	20
轻轻混匀，室温（25℃）条件下，30s 时于 340nm 处读取吸光值 A1，10min 后再读取 A2， $\Delta A = A1 - A2$ 。	

- 【注】1. 若 ΔA 小于 0.01，可以适当延长反应时间到 20min 后读取 A2，改变后的反应时间需代入计算公式重新计算。或适当加大样本量（如 100μL，则试剂四相应减少），则改变后的加样体积需代入计算公式重新计算。
2. 若下降趋势不稳定，可以每隔 20S 读取一次吸光值，选取一段线性下降的时间段来参与计算，相对应的 A 值也代入计算公式重新计算。
3. 若起始值 A1 太大如超过 2（如颜色较深的植物叶片，一般色素较高，则起始值相对会偏高），可以适当减少样本加样量，则改变后的加样体积需代入计算公式重新计算。或向待测样本中加少许活性炭混匀静置 5min 后 12000rpm, 4℃离心 10min，上清液用于检测；
4. 若 ΔA 的值大于 0.5，则需减少反应时间（如减少至 5min），或减少样本量（如 20μL），则改变后的反应时间 T 和样本量 V1 需代入计算公式重新计算。

五、结果计算：

1、按照样本质量计算：

酶活定义：每克组织每分消耗 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NADH-GPK}(\text{nmol/min/g 鲜重}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T = 156.8 \times \Delta A \div W$$

2、按样本蛋白浓度计算：

单位定义：每毫克组织蛋白在每分钟内氧化 1nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NADH-GPK}(\text{nmol/min/mg prot}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T = 156.8 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

ϵ ---NADH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$ ；

d---比色皿光径，1cm；

V---加入提取液体积，1mL；

V1---加入样本体积，0.08mL；

V2---反应体系总体积，0.78mL= $7.8 \times 10^{-4}\text{L}$ ；

T---反应时间，10min；

W---样本质量，g；

Cpr---样本蛋白质浓度，mg/mL；建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。