

叶绿体 3-磷酸甘油酸激酶(PGK)试剂盒说明书

(货号: G0612W 微板法 96 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 100mL×1 瓶	4℃保存	
提取液二	液体 100mL×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 1.1mL 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	4℃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 15mL×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:

酶标仪、96 孔板、可调式移液器、天平、震荡仪、水浴锅、低温离心机、研钵。

四、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 酶标仪预热 30min, 调节波长至 340nm, 设定温度 25℃。
- 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 10:10:10:140 比例配成混合液 (一枪加 170μL 该混合液) (该混合液用多少配多少, 现配现用)。
- ④ 在 96 孔板中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管
样本	20
试剂一	10
试剂二	10
试剂三	10
试剂四	140
混匀, 室温 (25°C) 条件下, 孵育 10min	
试剂五	10
轻轻混匀, 室温 (25°C) 条件下, 30s 时于 340nm 处读取吸光值 A1, 10min 后再读取 A2, ΔA=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 40μL, 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°C 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 10μL), 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。

$$\text{NADH-GPK}(\text{nmol/min/g 鲜重}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T = 321.6 \times \Delta A \div W$$

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 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NADH-GPK}(\text{nmol/min/mg prot}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T = 321.6 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

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

d---光径, 0.5cm;

V---加入提取液体积, 1mL;

V1---加入样本体积, 0.02mL;

V2---反应体系总体积, 0.2mL= 2×10^{-4} 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。