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，ΔA=A1-A2。	

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。

NADH-GPK(nmol/min/g 鲜重)=[$\Delta A \div (\varepsilon \times d) \times V2 \times 10^9$]÷(W×V1÷V)÷T=156.8×ΔA÷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。

NADH-GPK(nmol/min/mg prot)=[$\Delta A \div (\varepsilon \times d) \times V2 \times 10^9$]÷(V1×Cpr) ÷T=156.8×ΔA÷Cpr

ε---NADH 摩尔消光系数，6.22×10^3 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=7.8×10^{-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。