

叶绿体 3-磷酸甘油酸激酶(PGK)试剂盒说明书

(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。
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。
试剂四	液体 35mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂五	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。

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、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℃）。
- ③ 在 1mL 石英比色皿中依次加入：

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 的值在零附近, 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。

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

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。

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

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

V---加入提取液体积, 1mL;

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

W---样本质量, g。

d---比色皿光径, 1cm;

V1---加入样本体积, 0.08mL;

T---反应时间, 10min;