

叶绿体 3-磷酸甘油酸激酶(PGK)试剂盒说明书

(货号: ADS-W-T011 微板法 96 样 有效期: 3 个月)

一、指标介绍:

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:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
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 1 支	-20℃ 避光保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部(可手动甩一甩); 2. 加入 1.1mL 蒸馏水溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂二	粉剂 3 支	4℃ 保存	每支: 1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底; 2. 加入 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 1 支	-20℃ 保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底; 2. 加 1.1mL 蒸馏水溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂四	液体 35mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂五	粉剂 1 支	-20℃ 保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底; 2. 加入 1.1mL 蒸馏水溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。

三、实验器材:

研钵(匀浆机)、冰盒(制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅(烘箱、培养箱、金属浴)、96 孔板、离心管、酶标仪、震荡仪、蒸馏水(去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本(例如不同类型或分组)进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

1、样本提取:

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、检测步骤：

- 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℃）。
- ③ 在 96 孔板中依次加入：

试剂组分 (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℃）条件下，孵育 10min	
试剂五	10
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 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℃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。

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

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。

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

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

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， $0.2\text{mL} = 2 \times 10^{-4}\text{L}$ ；

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。