

## 叶绿体 3-磷酸甘油酸激酶(PGK)试剂盒说明书

(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<sup>+</sup>，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。 |
| 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。    |
| 试剂四  | 液体 15mL×1 瓶  | 4℃ 保存   |                                      |
| 试剂五  | 粉剂 mg×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。    |

### 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、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℃)。
- ③ 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℃）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，<br>$\Delta A=A1-A2$ 。 |     |

- 【注】1.若 $\Delta A$  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 40 $\mu$ L，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 $\Delta A$  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 10 $\mu$ L），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。

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

### 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 NADH 定义为一个酶活力单位。

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

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

d---比色皿光径，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。