

丙酮酸激酶 (Pyruvate kinase, PK) 试剂盒说明书

(货号: G0811W48 微板法 48 样)

一、产品简介:

丙酮酸激酶 (PK, EC 2.7.1.40) 广泛存在于动物、植物、微生物和培养细胞中, 催化糖酵解过程中的最后一步反应, 是糖酵解过程中的主要限速酶之一, 也是产生 ATP 的关键酶之一, 因此测定 PK 活性具有重要意义。

丙酮酸激酶催化磷酸烯醇式丙酮酸和 ADP 生成 ATP 和丙酮酸, 乳酸脱氢酶进一步催化 NADH 和丙酮酸生成乳酸和 NAD^+ , 在 340nm 下测定 NADH 下降速率, 即可反映 PK 活性。

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	液体 60mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 5mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉剂 mg×1 支	-20℃保存	使用前甩几下使试剂落入底部, 再加 3mL 的蒸馏水溶解备用。
试剂三	粉剂 mg×2 支	-20℃保存	每支使用前甩几下使试剂落入底部, 再加 0.6mL 的蒸馏水溶解备用。用不完的试剂分装后-20℃保存, 禁止反复冻融, 三天内用完。
试剂四	粉剂 mg×1 支	-20℃保存	使用前甩几下使试剂落入底部, 再加 1.2mL 的蒸馏水溶解备用。用不完的试剂分装后-20℃保存, 禁止反复冻融, 三天内用完。

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

四、丙酮酸激酶 (PK) 酶活测定:

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:

① 组织样本:

称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆。12000rpm, 4℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【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 细菌/细胞样本:

先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 取 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液; 冰浴超声波破碎细菌或细胞 (冰浴, 功率 20% 或 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次); 12000rpm, 4℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照细菌/细胞数量 (10^4 个): 提取液 (mL) 为 1000~5000:1 比例进行提取。

③ 血清样本: 直接检测。若浑浊, 离心后取上清检测。

2、上机检测:

① 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 340nm。

② 所有试剂可放在 37℃水浴 5-15min。

③ 试剂一和二和三可按照 90:50:20 比例配成混合液 (一枪加 160μL 该混合液) (该混合液

用多少配多少，现配现用）。

④ 依次在 96 孔板中加入：

试剂名称 (μL)	测定管
样本	20
试剂一	90
试剂二	50
试剂三	20
混匀，37℃下，静置 10min 后	
试剂四	20
混匀，37℃下，10s 时于 340nm 处读取吸光值 A1，5min 后读取吸光值 A2， $\Delta A = A1 - A2$ 。	

【注】1. 若 ΔA 值小于 0.01，可适当延长反应时 T（如由 5min 延至 15min 或更长读取 A2）；

或适当加大样本量 V1（如由 20μL 增至 40μL，则试剂一相应减少）；或增加样本取样质量 W；则改变后的 T 和 V1 和 W 需代入计算公式重新计算。

2. 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），可减少样本加样体积 V1（如减至 10μL，则补充 10μL 蒸馏水），则改变后 V1 需代入公式重新计算。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。

3. 若 A1 值低于 0.6 或 ΔA 大于 0.6，可减少样本加样体积 V1（如减至 10μL，则补充 10μL 蒸馏水）或减少反应时间 T（如由 5min 减至 2min 读取 A2），则改变后的 V1 和 T 代入公式计算。

4. 若下降趋势不稳定，可以每隔 10S 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。

五、结果计算：

1、按样本蛋白浓度计算：

酶活定义：每毫克组织蛋白每分钟消耗 1nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$PK(nmol/min/mg \text{ prot}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (Cpr \times V1 \div V) \div T = 643.1 \times \Delta A \div Cpr$$

2、按样本鲜重计算：

酶活定义：每克组织每分钟消耗 1nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$PK(nmol/min/g \text{ 鲜重}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (Cpr \times V1 \div V) \div T = 643.1 \times \Delta A \div W$$

3、按细菌/细胞密度计算：

酶活定义：每 1 万个细菌/细胞每分钟消耗 1nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$PK(nmol/min/10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 1.29 \times \Delta A$$

4、血清 PK 活力计算：

酶活定义：每毫升血清每分钟消耗 1nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$PK(nmol/min/mL) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div V1 \div T = 643.1 \times \Delta A$$

ϵ ---NADH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$ ； d---96 孔板光径，0.5cm；

V---加入提取液体积，1 mL；

V1---加入样本体积，0.02 mL；

V2---反应体系总体积， $2 \times 10^{-4} \text{ L}$ ；

T---反应时间，5min；

500---细菌或细胞总数，万。

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。