

丙酮酸激酶 (PK) 活性检测试剂盒 (分光光度计法)  
(本试剂盒仅供科研使用)

### 产品包装

产品编号	产品名称	产品规格
YFX0155	丙酮酸激酶 (PK) 活性检测试剂盒	50 管/48 样

### 产品内容

名称	规格	储存条件
提取液	液体 60mL × 1 瓶	4℃
试剂一	液体 50mL × 1 瓶	4℃
试剂二	粉剂 × 2 瓶: 临用前取出一瓶, 加入 22.5ml 试剂一和 2.65ml 蒸馏水充分溶解, 置于 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其它物种) 水浴 5min; 现配现用	-20℃
试剂三	液体 20μL × 2 瓶: 临用前取出试剂三支, 加入 1.5ml 蒸馏水充分溶解待用; 现配现用。	4℃

### 一、产品说明

丙酮酸激酶 (Pyruvate kinase, 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。

PK 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<sup>+</sup>, 在 340nm 下测定 NADH 下降速率, 即可反映 PK 活性。

### 二、自备材料

紫外分光光度计、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、1mL 石英比色皿、研钵、冰和蒸馏水。

### 三、样品制备

- 1、组织: 按照组织质量 (g) : 提取液体积(ml)为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1ml 提取液), 进行冰浴匀浆。8000g 4℃ 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。
- 2、细胞或者细菌: 先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 按照细菌或细胞数量 (10<sup>4</sup> 个) : 提取液体积 (ml) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 500 万细菌或细胞加入 1ml 提取液), 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); 8000g 4℃ 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。
- 3、血清/血浆: 直接检测。

### 四、操作步骤

**正式测定前, 必需取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。**

- 1、分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 340nm, 蒸馏水调零。
- 2、在 1ml 石英比色皿中加入 50μl 样本、50μl 试剂三工作液和 900μl 试剂二工作液, 混匀, 立即记录 340nm 处 20s 时的吸光值 A1 和 2min 20s 后的吸光值 A2, 计算  $\Delta A = A1 - A2$ 。

## 五、PK 活性的计算

1、按照样本蛋白浓度计算:

单位的定义: 每 mg 组织蛋白每分钟消耗 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$PK \text{ (nmol/min /mg prot)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V \text{ 样} \times Cpr) \div T = 2613 \times \Delta A \div Cpr。$$

2、按照样本鲜重计算:

单位的定义: 每 g 组织每分钟消耗 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$PK \text{ (nmol/min /g 鲜重)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 2613 \times \Delta A \div W。$$

3、按照细胞/细菌数量计算:

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

$$PK \text{ (nmol/min /} 10^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 5.226 \times \Delta A。$$

4、按照血清/血浆体积计算:

单位的定义: 每毫升血清 (浆) 每分钟消耗 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$PK \text{ (nmol/min/ml)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V \text{ 样} \div T = 2613 \times \Delta A。$$

V 反总: 反应体系总体积,  $9.75 \times 10^{-4}$  L;  $\epsilon$ : NADH 摩尔消光系数,  $6.22 \times 10^3$  L / mol /cm;

d: 比色皿光径, 1cm; V 样: 加入样本体积, 0.03 ml; V 样总: 加入提取液体积, 1 ml;

T: 反应时间, 2min; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/ml; W: 样本质量, g; 500: 细菌或细胞总数, 500 万。