

**丙酮酸激酶 (PK) 活性检测试剂盒 (微量法)**  
(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
YFX0156	丙酮酸激酶 (PK) 活性检测试剂盒 (微量法)	100 管/96 样

**产品内容**

名称	规格	储存条件
提取液	液体 100mL × 1 瓶	4℃
试剂一	液体 20mL × 1 瓶	4℃
试剂二	粉剂 × 2 瓶: 临用前取出一瓶, 加入 9mL 试剂一和 1.06mL 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 10μL × 2 瓶: 临用前取出一支, 加入 0.6mL 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/酶标仪、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔板、研钵、冰和蒸馏水。

**三、样品准备**

- 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/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、血浆/血清: 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、酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 340nm, 蒸馏水调零。
- 2、在微量石英比色皿或 96 孔板中加入 10μL 样本、10μL 试剂三工作液和 180μL 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

$\Delta A = A_1 - A_2$ .

## 五、PK 活性的计算

### A. 用 96 孔板测定的计算公式如下:

1、按照组织蛋白浓度计算

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。

$$PK \text{ (nmol/min /mg prot)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V \text{ 样} \times Cpr) \div T = 1608 \times \Delta A \div Cpr.$$

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。

$$PK \text{ (nmol/min /g 鲜重)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 1608 \times \Delta A \div W.$$

3、按照细菌/细胞密度计算

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。

$$PK \text{ (nmol/min /} 10^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 3.216 \times \Delta A.$$

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。

$$PK \text{ (nmol/min/mL)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V \text{ 样} \div T = 1608 \times \Delta A.$$

V 反总: 反应体系总体积,  $2 \times 10^{-4}$  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, 0.01 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。

### B. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下:

1、按照组织蛋白浓度计算

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。

$$PK \text{ (nmol/min /mg prot)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V \text{ 样} \times Cpr) \div T = 3216 \times \Delta A \div Cpr.$$

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。

$$PK \text{ (nmol/min /g 鲜重)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 3216 \times \Delta A \div W.$$

3、按照细菌/细胞密度计算

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。

$$PK \text{ (nmol/min /} 10^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 6.432 \times \Delta A.$$

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。

$$PK \text{ (nmol/min /mL)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V \text{ 样} \div T = 3216 \times \Delta A.$$

V 反总: 反应体系总体积,  $2 \times 10^{-4}$  L;  $\epsilon$ : NADH 摩尔消光系数,  $6.22 \times 10^3$  L / mol / cm; d: 96 孔板光径, 0.5cm; V 样: 加入样本体积, 0.01 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。