

丙酮酸激酶(PK)活性检测试剂盒说明书

Pyruvate Kinase Assay Kit

紫外分光光度法

货号: AK058

规格: 50T/48S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
提取液 ES07	60ml×1	4℃保存
AK058-A	45ml×1	4℃保存
AK058-B	粉剂×1 支	-20℃保存
工作液的配制: 临用前将 AK058-B 转移至 AK058-A 中, 充分溶解备用, 现配现用。		
AK058-C	粉剂×1 支	-20℃保存; 临用前每支加入 1.5mL 双蒸水充分溶解备用, 剩余试剂需 4℃保存, 一周有效;
AK058-D	液体×1 支	4℃保存; 临用前根据用量按照 AK058-D:蒸馏水为 1:20 的体积比例充分混匀, 冰上放置备用, 现用现配。

简介:

意义: 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。

原理: 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⁺, 在 340nm 下测定 NADH 下降速率, 即可反映 PK 活性。

自备用品:

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。

样品处理 (丙酮酸激酶提取):

1. 细菌或培养细胞: 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 (10⁴ 个): 提取液 ES07 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 ES07), 超声波破碎 (冰浴, 功率 20% 或 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次), 静置 30min, 8000g, 4℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。
2. 组织: 按照组织质量 (g): 提取液 ES07 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 ES07), 进行冰浴匀浆, 静置 30min, 8000g, 4℃离心 10min, 取上清待测。
3. 血清 (浆) 样品: 直接检测。

测定步骤:

1. 分光光度计或酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 340nm, 蒸馏水调零。
2. 工作液的配制: 临用前将 AK058-B 转移至 AK058-A 中, 充分溶解备用, 现配现用。
3. 将工作液、AK058-C 置于 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其他物种) 预热 10 分钟。
4. 按照下表操作:

试剂名称	测定管 (ul)
工作液	900
AK058-C	30
AK058-D	15

待测样品	30
------	----

将上述试剂按顺序加入 1 mL 石英比色皿中，立即混匀，加样本的同时开始计时，在 340 nm 波长下记录 20 秒时的初始吸光度 A1，比色后迅速将比色皿连同反应液一起放入 37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）水浴中准确反应 2 分钟；迅速取出比色皿并擦干，340 nm 下比色，记录 2 分 20 秒时的吸光度 A2，计算 $\Delta A = A1 - A2$ 。

PK 活力单位的计算：

1. 血清（浆）PK 活力的计算：

单位的定义：每毫升血清（浆）在反应体系中每分钟消耗 1nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$PK (U/mL) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 2613 \times \Delta A$$

2. 组织、细菌或细胞中 PK 活力的计算：

（1）按样本蛋白浓度计算：

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

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

（2）按样本鲜重计算：

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

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

（3）按细菌或细胞密度计算：

单位的定义：每 1 万个细菌或细胞在反应体系中每分钟消耗 1nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

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

注： V 反总：反应体系总体积， $9.75 \times 10^{-4} \text{L}$ ； ϵ ：NADH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3 \text{L/mol/cm}$ ；d：比色皿光径，1 cm；V 样：加入样本体积，0.03mL；V 样总：加入提取液体积，1mL；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。

注意事项：

1. 测定过程中 AK058-D、样本在冰上放置，以免变性和失活。
2. 比色皿中反应液的温度尽量保持 37℃或 25℃，取小烧杯一只装入一定量的 37℃或 25℃蒸馏水，将此烧杯放入 37℃或 25℃水浴锅中。在反应过程中把比色皿连同反应液放在此烧杯中。
3. 最好两个人同时做此实验，一个人比色，一个人计时，以保证实验结果的准确性。