

丙酮酸激酶(PK)活性检测试剂盒说明书

Pyruvate Kinase Assay Kit

微量法

货号: AK059

规格: 100T/96S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
提取液 ES07	100ml×1	4℃保存
AK059-A	20ml×1	4℃保存
AK059-B	粉剂×1 支	-20℃保存
在 AK059-B 瓶中加入 17mL AK059-A 和 1mL 蒸馏水充分溶解, 置于 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其他物种) 水浴 5 分钟, 现配现用。		
AK059-C	液体 1 支	4℃保存, 临用前根据用量按照 AK059-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/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 (UV 板)、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. 紫外分光光度计/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, 按照下表操作

试剂名称	测定管 (ul)
样本	10
AK059-C	10
AK059-B	180
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 $\Delta A = A1 - A2$ 。	

PK 活力单位的计算:

a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下：

1. 血清（浆）PK 活力的计算：

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

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

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。

$$PK (U/mg \text{ prot}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T = 1608 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

（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。

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

（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。

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

注： $V_{\text{反总}}$ ：反应体系总体积， $2 \times 10^{-4} \text{L}$ ； ϵ ：NADH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3 \text{L/mol/cm}$ ； d ：比色皿光径，1cm； $V_{\text{样}}$ ：加入样本体积，0.01mL； $V_{\text{样总}}$ ：加入提取液体积，1mL； T ：反应时间，2min； C_{pr} ：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 96 孔板测定的计算公式如下：

1. 血清（浆）PK 活力的计算：

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

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

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。

$$PK (U/mg \text{ prot}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T = 3216 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

（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。

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

（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。

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

注： $V_{\text{反总}}$ ：反应体系总体积， $2 \times 10^{-4} \text{L}$ ； 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； $V_{\text{样}}$ ：加入样本体积，0.01mL； $V_{\text{样总}}$ ：加入提取液体积，1mL； T ：反应时间，2min； C_{pr} ：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 Ak059-C、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。或酶标板放入 37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）恒温培养箱中孵育。
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。