

丙酮酸激酶 (Pyruvate kinase, PK) 试剂盒说明书

(货号: ADS-W-T002 微板法 96 样 有效期: 3 个月)

一、指标介绍:

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:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 120mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 10mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉剂 1 瓶	-20℃避光保存	1. 开盖前注意使粉剂落入底部 (可手动甩一甩); 2. 加入 5.5mL 的蒸馏水溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂三	粉剂 4 支	-20℃保存	每支: 1. 临用前 8000g 4℃离心 2min 使粉剂落入管底 (可手动甩一甩); 2. 再加 0.55mL 的蒸馏水溶解备用; 3. 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	液体 1 瓶	-20℃保存	1. 开盖前注意使粉剂落入底部 (可手动甩一甩); 2. 加入 2.2mL 的蒸馏水溶解备用; 3. 用不完的试剂分装后-20℃保存, 禁止反复冻融, 三天内用完。

三、实验器材:

研钵 (匀浆机)、冰盒 (制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅 (烘箱、培养箱、金属浴)、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本 (例如不同类型或分组) 进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

1、样本提取:

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（10⁴个）：提取液（mL）为 1:1000~5000 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、检测步骤：

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 依次在 96 孔板中加入：

试剂组分（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。

$$PK(nmol/min/mg \text{ prot}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times 10^9] \div (Cpr \times V_1 \div V) \div T = 643.1 \times \Delta A \div Cpr$$

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。

$$PK(nmol/min/g \text{ 鲜重}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times 10^9] \div (W \times V_1 \div V) \div T = 643.1 \times \Delta A \div W$$

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。

$$PK(nmol/min/10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times 10^9] \div (500 \times V_1 \div V) \div T = 1.29 \times \Delta A$$

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。

$$PK(\text{nmol/min/mL}) = [\Delta A \div (\varepsilon \times d) \times V_2 \times 10^9] \div V_1 \div T = 643.1 \times \Delta A$$

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; V_1 ---加入样本体积, 0.02 mL;
 V_2 ---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。