

组织及血液丙酮酸激酶（PK）活性检测试剂盒说明书

产品货号	产品名称	包装规格	测定方法
AMHB9-C48	组织及血液丙酮酸激酶（PK）试剂盒	48T	常量法

产品说明：

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⁺，在340nm下测定NADH下降速率，即可反映PK活性。

试剂组成：

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 60 mL×1 瓶	2-8℃ 保存
试剂一	液体 50 mL×1 瓶	2-8℃ 保存
试剂二A	粉剂×1瓶	-20℃ 保存
试剂二B	粉剂×2 支	-20℃ 保存
试剂三	粉剂×1支	-20℃ 保存
试剂四	液体 45μL×1 支	2-8℃ 保存

溶液的配制：

- 1、试剂二A：临用前加入 1.2mL 蒸馏水溶解，用不完的试剂可-20℃分装保存4 周，避免反复冻融；
- 2、试剂二B：临用前取一支加入0.7mL 蒸馏水溶解，用不完的试剂可-20℃分装保存4 周，避免反复冻融；
- 3、试剂三：临用前加入 1.8mL 蒸馏水充分溶解，用不完的试剂可-20℃分装保存4 周，避免反复冻融；
- 4、试剂四：临用前根据用量按照试剂四：蒸馏水=5 μL:100 μL (7T) 的体积比例充分混匀，冰上放置备用，现用现配；
- 5、工作液的配制：按试剂一：试剂二A：试剂二B = 860μL：20μL：20μL (1T) 的比例配制，现用现配。

操作步骤：

一、样本处理

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200W，超声3s，间隔 10s，重复30 次）；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。
3. 血清（浆）等其他液体：直接检测。若有沉淀请离心后取上清待测。

二、测定步骤

1. 分光光度计预热 30min 以上，调节波长至340nm，蒸馏水调零。

2. 工作液临用前于37℃预热 10min。
3. 加样表:

试剂名称 (μL)	测定管
工作液	900
试剂三	30
试剂四	15
样本	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℃ 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 $\Delta A = A1 - A2$ 。

三、PK 活性的计算

1. 按液体体积计算

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

3. 按样本质量计算

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

4. 按细菌或细胞数量计算

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 活性 (U/10⁴ cell) = $[\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (N \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 2613 \times \Delta A \div N$

V_{反总}: 反应体系总体积, 9.75×10⁻⁴L; ε: NADH 摩尔消光系数, 6.22×10³L/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; C_{pr}: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量, g; N: 细菌或细胞总数, 以万计。

注意事项:

- 1、测定过程中试剂四、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℃, 取小烧杯一只装入一定量的 37℃ 蒸馏水, 将此烧杯放入 37℃ 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。
