

## 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-M96	组织及血液丙酮酸激酶（PK）试剂盒	96T	微量法

### 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<sup>+</sup>，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 110 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 20 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二A	粉剂×1支	-20℃保存
试剂二B	粉剂×2 支	-20℃保存
试剂二C	粉剂×1支	-20℃保存
试剂三	液体20μL×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，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 1 支加入0.645mL 蒸馏水，用不完的试剂可-20℃分装保存4 周，避免反复冻融；
- 3、试剂二C：临用前加入 1.2mL 蒸馏水，用不完的试剂可-20℃分装保存4 周，避免反复冻融；
- 4、工作液的配制：根据样本按试剂一：试剂二A：试剂二B：试剂二C= 750μL： 50μL： 50μL： 50μL（5T）的比例配制，现用现配；
- 5、试剂三：临用前根据用量按照试剂三:蒸馏水=5μL:295μL（30T）的比例充分混匀，冰上放置备用，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（ $10^4$  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、紫外分光光度计/酶标仪预热30min以上， 调节波长至340nm， 分光光度计蒸馏水调零。
- 2、工作液临用前于37℃预热10min。
- 3、加样表：

试剂名称（ $\mu\text{L}$ ）	测定管
样本	10
试剂三	10
工作液	180

将上述试剂按顺序加入微量石英比色皿或96孔UV板中， 立即充分混匀后于340nm处测定20s时的吸光值 $A_1$ ， 迅速置于37℃准确反应2min（酶标仪有控温功能可将温度调至37℃）， 拿出迅速擦干测定2min20s时的吸光值 $A_2$ 。 计算 $\Delta A = A_1 - A_2$ 。

## 三、PK 活性计算

### A . 用微量石英比色皿测定的计算公式如下：

#### 1、按液体体积计算

单位的定义：每毫升液体每分钟消耗1nmol NADH定义为一个酶活力单位。 PK活性（U/mL）= $[\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 1608 \times \Delta A$

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

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

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

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，1 cm；V 样：加入样本体积，0.01mL；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。

---

**B. 用96孔UV板测定的计算公式如下:**

1、按液体体积的计算

单位的定义: 每毫升液体每分钟消耗1nmol NADH定义为一个酶活力单位。

$$\text{PK活性 (U/mL)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 2680 \times \Delta A$$

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。

$$\text{PK活性 (U/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) \div T = 2680 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

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。

$$\text{PK活性 (U/g 质量)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 2680 \times \Delta A \div W$$

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。

$$\text{PK活性 (U/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (N \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 2680 \times \Delta A \div N$$

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, 0.6cm; V样: 加入样本体积, 0.01mL; 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; N: 细菌或细胞总数, 以万计。

**注意事项:**

1. 测定过程中试剂三、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°C, 取小烧杯一只装入一定量的37°C蒸馏水, 将此烧杯放入37°C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°C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。