

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
PMHE7-M96	丙酮酸激酶（PK）活性检测试剂盒	96T	微量法

一、测定意义

PK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。

二、测定原理

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。

三、试剂组成

试剂名称	试剂装量(96T)	保存条件
提取液	液体 120mL×1 瓶	4-8℃ 保存
试剂一	液体 25mL×1 瓶	4-8℃ 保存
试剂二	粉剂 ×1 瓶	-20℃ 保存
临用前取试剂二 一瓶，加入 22.5mL 试剂一和 2.65mL 蒸馏水充分溶解，现配现用。		
试剂三	液体 25μL×1 瓶	4-8℃ 保存
临用前取试剂三一支，加入 1.5mL 蒸馏水充分溶解待用，现配现用。		

四、操作步骤

样本前处理

植物组织提取液的制备：取一定量植物组织擦净水分及杂质，剪碎后放入研钵，加入液氮，研磨成粉状后转移出来，然后准确称重，按照组织质量（g）：提取液体积(mL)为 1：5~10 的比例（建议称重 0.1g，加入提取液 1mL），旋涡混匀抽提 3-5 分钟或者使用组织破碎仪冰浴提取，8000g，4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

五、测定步骤

- 1、酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 340nm，蒸馏水调零。
- 2、测定前将试剂恢复至常温；
- 3、在微量石英比色皿或 96 孔UV板中加入 10μL 样本、10μL 试剂三和 180μL 试剂二，混匀，立即记录 340nm 处 20s 时的吸光值 A1 和 2min20s 后的吸光值 A2，计算 $\Delta A=A1-A2$ 。

六、植物样本丙酮酸激酶（PK）活性计算

- a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

1) 按样本蛋白浓度计算:

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

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

2) 按样本鲜重计算:

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

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

V 反总: 反应体系总体积, 2×10^{-4} L; ϵ : NADH 摩尔消光系数, 6.22×10^3 L / mol / cm; d:

比色皿光径, 1cm; V 样: 加入样本体积, 0.01 mL; V 样总: 加入提取液体积, 1 mL; T:

反应时间, 2min; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量, g;

b. 用 96 孔 UV 板测定的计算公式如下

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 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

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

2) 按样本鲜重计算:

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

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

V 反总: 反应体系总体积, 2×10^{-4} L; ϵ : NADH 摩尔消光系数, 6.22×10^3 L / mol / cm; d:

96 孔板光径, 0.6cm; V 样: 加入样本体积, 0.01 mL; V 样总: 加入提取液体积, 1 mL; T:

反应时间, 2min; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量, g。

七、注意事项

- 1、正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。
- 2、试剂二溶解后可分装冷冻保存 1 个月。

八、公司介绍

陌凡生物科技有限公司是一家专业从事转基因检测、食品安全以及动植物疫病检测为核心业务的生物科技公司。能够为客户提供动植物疫病检测试剂、小分子抗原抗体、植物激素、植物抗体、重组蛋白等优质产品。自主研发了涵盖分子生物学、细胞生物学、免疫学、生物医学等领域的各种试剂盒。产品覆盖面广, 品质可靠。