

## 丙酮酸激酶 (Pyruvate kinase, PK) 试剂盒说明书

(货号: ADS-F-T002 分光法 48 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  $\text{NAD}^+$ , 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 60mL×1 瓶 | 4°C 保存     |                                                                                             |
| 试剂一  | 液体 20mL×1 瓶 | 4°C 保存     |                                                                                             |
| 试剂二  | 粉剂 1 瓶      | -20°C 避光保存 | 1. 开盖前注意使粉体落入底部 (可手动甩一甩);<br>2. 加入 11mL 的蒸馏水溶解;<br>3. 保存周期与试剂盒有效期相同。                        |
| 试剂三  | 粉剂 4 支      | -20°C 保存   | 1. 开盖前注意使粉体落入底部 (可手动甩一甩);<br>2. 加入 0.6mL 的蒸馏水溶解备用;<br>3. 用不完的试剂分装后 -20°C 保存, 禁止反复冻融, 三天内用完。 |
| 试剂四  | 液体 1 瓶      | -20°C 保存   | 1. 开盖前注意使粉体落入底部 (可手动甩一甩);<br>2. 加入 2.2mL 的蒸馏水溶解备用;<br>3. 用不完的试剂分装后 -20°C 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)、1ml 石英比色皿、离心管、紫外分光光度计、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°C 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（ $10^4$  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 紫外分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 340nm，蒸馏水调零。
- ② 所有试剂可放在 37℃ 水浴 5-15min。
- ③ 依次在 1mL 石英比色皿（光径 1cm）中加入：

| 试剂组分（μL）                                                             | 测定管 |
|----------------------------------------------------------------------|-----|
| 样本                                                                   | 80  |
| 试剂一                                                                  | 360 |
| 试剂二                                                                  | 200 |
| 试剂三                                                                  | 40  |
| 混匀，37℃ 下，静置 10min 后                                                  |     |
| 试剂四                                                                  | 40  |
| 混匀，10s 时于 340nm 处读取吸光值 A1，<br>5min 后读取吸光值 A2， $\Delta A = A1 - A2$ 。 |     |

【注】1. 若  $\Delta A$  值小于 0.01，可适当延长反应时间 T（如由 5min 延至 15min 或更长读取 A2）。或适当加大样本量 V1（如由 80μL 增至 160μL，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 需代入公式重新计算。

2. 若 A1 太大如超过 2（如颜色较深的植物叶片，一般色素较高，则起始值会偏高）可减少样本加样体积 V1（如减至 40μL，则补充 40μL 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  $\Delta A$  大于 0.6，可减少样本加样体积 V1（如减至 40μL，则补充 40μL 蒸馏水）或减少反应时间 T（如 2min），则改变后的 V1 和 T 代入公式重新算。

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。

$$PK(nmol/min/mg \text{ prot}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (Cpr \times V1 \div V) \div T = 289.4 \times \Delta A \div Cpr$$

### 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。

$$PK(nmol/min/g \text{ 鲜重}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T = 289.4 \times \Delta A \div W$$

### 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。

$$PK(nmol/min/10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.579 \times \Delta A$$

### 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。

$$PK(nmol/min/mL) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div V1 \div T = 289.4 \times \Delta A$$

$\epsilon$ ---NADH 摩尔消光系数,  $6.22 \times 10^3 \text{ L} / \text{mol} / \text{cm}$ ;       $d$ ---光径, 1cm;  
 $V$ ---加入提取液体积, 1 mL;       $V_1$ ---加入样本体积, 0.08 mL;  
 $V_2$ ---反应体系总体积,  $7.2 \times 10^{-4} \text{ L}$ ;       $T$ ---反应时间, 5min;  
500---细菌或细胞总数, 万;       $W$ ---样本质量, g;  
 $C_{pr}$ ---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。

