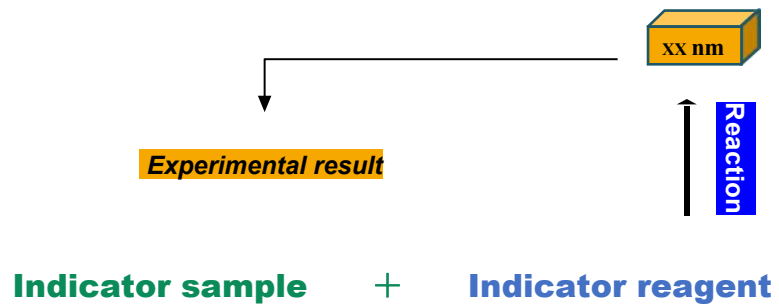


上海茁彩生物科技有限公司
Shanghai zcibio technology Co., Ltd.



生化检测原理示意图

丙酮酸激酶（PK）检测试剂盒说明书

微量法

正式测定前务必取2-3个预期差异较大的样本做预测定

产品内容：

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液	液体 100mL×1 瓶	4℃保存	-
试剂一	液体 20 mL×1 瓶	4℃保存	-
试剂二	粉剂×1 支	-20℃保存	-
试剂三	液体×1 支	4℃保存	-

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。

需自备的仪器和用品：

紫外分光光度计/酶标仪、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔板（UV 板）、研钵、冰和蒸馏水。

操作步骤：

一、样本的前处理

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 20% 或者 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）样品：直接检测。

二、测定步骤及加样表：

- 1 紫外分光光度计/酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 340nm，蒸馏水调零。
- 2 样本测定
 - 在试剂二瓶中加入 17mL 试剂一和 1mL 蒸馏水充分溶解，置于 37°C（哺乳动物）或 25°C（其他物种）水浴 5 分钟，现配现用。
 - 在试剂三中加入 1mL 蒸馏水充分溶解，冰上放置备用，现配现用。
 - 在微量石英比色皿或 96 孔板中加入 10 μL 样本、10 μL 试剂三和 180 μL 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 $\Delta A = A1 - A2$ 。

三、PK 活性计算：

(1) 用微量石英比色皿测定的计算公式如下：

1、血清（浆）PK 活力的计算：

单位的定义：每毫升血清（浆）每分钟消耗 1nmolNADH 定义为一个酶活力单位。

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

$$= 1608 \times \Delta A \div 2$$

2. 组织、细菌或细胞中 PK 活力的计算：

(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 1nmolNADH 定义为一个酶活力单位。

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

$$= 1608 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

(2) 按样本鲜重计算

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

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

$$= 1608 \times \Delta A \div W$$

(3) 按细菌或细胞密度计算

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 1nmolNADH 定义为一个酶活力单位。

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

$$= 3.216 \times \Delta A$$

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，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。

(2) 用 96 孔板 (UV板) 测定的计算公式如下:

1、血清 (浆) PK 活力的计算:

单位的定义: 每毫升血清 (浆) 每分钟消耗 1nmolNADH 定义为一个酶活力单位。PK (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、组织、细菌或细胞中 PK 活力的计算:

(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 1nmolNADH 定义为一个酶活力单位。

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

(2) 按样本鲜重计算

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

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

(3) 按细菌或细胞密度计算

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 1nmolNADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{PK (U/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 5.36 \times \Delta A$$

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 (UV 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; 500: 细菌或细胞总数, 500 万。

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 或 25°C, 取小烧杯一只装入一定量的 37°C 或 25°C 蒸馏水, 将此烧杯放入 37°C 或 25°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 (哺乳动物) 或 25°C (其它物种) 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