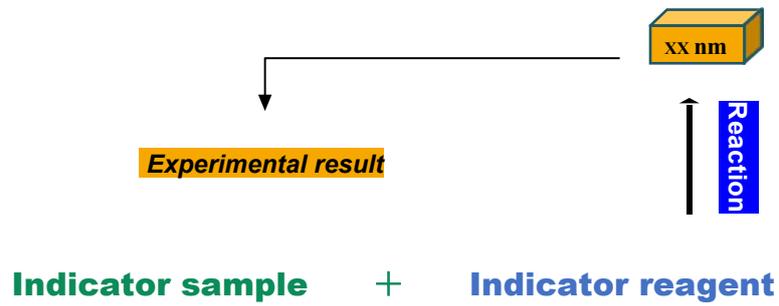


上海茁彩生物科技有限公司  
Shanghai zcibio technology Co., Ltd.



生化检测原理示意图

## 丙酮酸激酶 (Pyruvate kinase, PK) 试剂盒说明书

紫外分光光度法

正式测定前务必取 2-3个预期差异较大的样本做预测定

### 测定意义：

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AT的关键酶之一，因此测定PK活性具有重要意义。

### 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<sup>+</sup>，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、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、1mL 石英比色皿、研钵、冰和蒸馏水

### 试剂的组成和配制

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液	60mL×1瓶	4℃保存	-
试剂一	液体 45mL×1瓶	4℃保存	-
试剂二	粉剂×1支	-20℃保存	-
试剂三	粉剂×1支	-20℃保存	临用前加入1.5mL蒸馏水充分溶解备用；用不完的试剂4℃保存一周；
试剂四	液体×1支	4℃保存	临用前加入900 μL蒸馏充分溶解备用；用不完的试剂 4℃保存一周；

### 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 (10<sup>4</sup>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。

### 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、工作液的配制：临用前将试剂二转移至试剂一中，充分溶解待用；现配现用；
- 3、将工作液、试剂三和试剂四37℃ (哺乳动物) 或25℃ (其它物种) 预热10分钟。
- 4、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1mL石英比色皿中，立即混匀，加样本的同时开始计时，340nm波长下记录20秒时的初始吸光度A1和2分20秒时的吸光度A2，计算 $\Delta A=A1-A2$ 。

#### PK 活性计算

##### 1、血清（浆）中 PK 活力的计算：

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

$$PK \text{ (nmol/min/mL)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 2613 \times \Delta A$$

##### 2、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 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

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

###### (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。

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

###### (3) 按细菌或细胞密度计算：

单位的定义：每 1 万个细菌或细胞每分钟消耗 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$PK \text{ (nmol/min /} 10^4 \text{cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ = 5.226 \times \Delta A$$

V 反总：反应体系总体积， $9.75 \times 10^{-4}$  L； $\epsilon$ ：NADH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3$  L/mol/cm；d：比色皿光径，1cm；V 样：加入样本体积，0.03 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；500：细菌或细胞总数，500 万。