#

**丙酮酸激酶(PK)活性检测试剂盒说明书**

**Pyruvate Kinase Assay Kit**

**紫外分光光度计**

## 货号： RC22022

**规格：50T/48S**

**产品组成及保存条件：**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 编号 | 规格 | 储存条件 |
| 提取液 ES07 | 60ml×1 | 4℃保存 |
|  RC22022-A | 45ml×1 | 4℃保存 |
|  RC22022-B | 粉剂×1 支 | -20℃保存 |
| 工作液的配制：临用前将 RC22022-B 转移至 RC22022-A 中，充分溶解备用，现配现用。 |
|  RC22022-C | 粉剂×1 支 | -20℃保存；临用前每支加入 1.5mL 双蒸水充分溶解备用，剩余试剂需 4℃保存，一周有效； |
|  RC22022-D | 1 支 | 4℃保存；临用前每支加入 900µL 双蒸水充分溶解备用，剩余试剂需 4℃保存，一周有效； |

**简介：**

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，也是产生 ATP 的关键酶之一，因此测定 PK 活性具有重要意义。

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。

## 自备用品：

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。**样品处理（**丙酮酸激酶提取**）：**

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 ES07 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 ES07），超声波破碎（冰浴，功率 20％或 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次），静置 30min，8000g， 25℃离心 10min，取上清待测。
2. 组织：按照组织质量（g）：提取液 ES07 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 ES07），进行冰浴匀浆，静置 30min，8000g，25℃离心 10min，取上清待测。
3. 血清（浆）样品：直接检测。**测定步骤：**
4. 分光光度计或酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 340nm，蒸馏水调零。
5. 工作液的配制：临用前将 RC22022-B 转移至 RC22022-A 中，充分溶解备用，现配现用。
6. 将工作液、 RC22022-C 置于 37℃（哺乳动物）或 25℃（其他物种）预热 10 分钟。
7. 在微量石英比色皿或 96 孔板，按照下表操作

|  |  |
| --- | --- |
| 试剂名称 | 测定管 (ul) |
| 工作液 | 900 |
|  RC22022-C | 30 |
|  RC22022-D | 15 |

|  |  |
| --- | --- |
| 待测样品 | 30 |

将上述试剂按顺序加入 1 mL 石英比色皿中，立即混匀，加样本的同时开始计时，在 340 nm 波长下记录 20 秒时的初始吸光度 A1，比色后迅速将比色皿连同反应液一起放入 37℃（哺乳动物）或25℃（其它物种）水浴中准确反应 2 分钟；迅速取出比色皿并擦干，340 nm 下比色，记录 2 分 20 秒时的吸光度 A2，计算∆A=A1-A2。

## PK 活力单位的计算：

1. 血清（浆）PK 活力的计算:

单位的定义：每毫升血清（浆）在反应体系中每分钟消耗 1nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

PK (U/mL) = [△A×V 反总÷(ε×d)×109] ÷V 样÷T = 2613×△A

1. 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 1nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

PK (U/mg prot) = [△A×V 反总÷(ε×d)×109] ÷(Cpr×V 样)÷T = 2613×△A ÷Cpr

* 1. 按样本鲜重计算：

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 (U/g 鲜重) = [△A×V 反总÷(ε×d)×109] ÷(W×V 样÷V 样总)÷T = 2613×△A ÷W

* 1. 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 1nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

PK (U/104 cell) = [△A×V 反总÷(ε×d)×109] ÷(500×V 样÷V 样总)÷T = 5.226×△A

**注：** V 反总：反应体系总体积，9.75×10-4L；ε：NADH 摩尔消光系数，6.22×103L/mol/cm；d： 比色皿光径，1 cm；V 样：加入样本体积，0.03mL；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 RC22022-D、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℃或 25℃，取小烧杯一只装入一定量的 37℃或 25℃蒸馏水， 将此烧杯放入 37℃或 25℃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。
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。