

丙酮酸激酶 (Pyruvate kinase, PK) 试剂盒说明书

(微板法 96 样)

一、产品简介:

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 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:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 120mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	液体 5mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂二	粉剂 mg×1 瓶	4℃ 保存	使用前甩几下使试剂落入底部, 再加 10.2mL 的蒸馏水溶解备用。
试剂三	粉剂 mg×4 支	-20℃ 保存	每支使用前甩几下使试剂落入底部, 再加 0.55mL 的蒸馏水溶解备用。用不完的试剂分装后-20℃保存, 禁止反复冻融, 三天内用完。
试剂四	液体 μL ×1 支	-20℃ 保存	使用前甩几下使试剂落入底部, 再加 2.1mL 的蒸馏水溶解备用。

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

四、丙酮酸激酶 (PK) 酶活测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

1、样本制备:

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℃ 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、上机检测:

① 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 340nm。

② 所有试剂解冻至室温 (25℃)。

③ 依次在 96 孔板中加入:

试剂名称 (μL)	测定管
样本	20
试剂一	40
试剂二	100
试剂三	20
混匀, 37°C下, 静置 10min 后	
试剂四	20
混匀, 37°C下, 10s 时于 340nm 处读取吸光值 A1, 5min 后读取吸光值 A2, $\Delta A=A1-A2$ 。	

- 【注】** 1. 若 ΔA 的值在零附近, 可以适当延长反应时间到 15min 或更长读取 A2, 改变后的反应时间需代入计算公式重新计算。或适当加大样本量, 则改变后的加样体积需代入计算公式重新计算。
2. 若起始值 A1 太大如超过 2 (如颜色较深的植物叶片, 一般色素较高, 则起始值相对会偏高), 可减少样本加样体积 V1 (如减至 10μL, 则补充 10μL 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°C 离心 10min, 上清液用于检测;
3. 若 A1 值低于 0.6 或 ΔA 大于 0.6, 可减少样本加样体积 V1 (如减至 10μL, 则补充 10μL 蒸馏水) 或减少反应时间 T (如 2min), 则改变后的 V1 和 T 代入公式计算。
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。

$$PK(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot})=[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (Cpr \times V1 \div V) \div T = 643.1 \times \Delta A \div Cpr$$

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。

$$PK(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重})=[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (Cpr \times V1 \div V) \div T = 643.1 \times \Delta A \div W$$

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。

$$PK(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell})=[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 1.29 \times \Delta A$$

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。

$$PK(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL})=[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div V1 \div T = 643.1 \times \Delta A$$

ϵ ---NADH 摩尔消光系数, $6.22 \times 10^3 \text{ L}/\text{mol}/\text{cm}$; d---96 孔板光径, 0.5cm;

V---加入提取液体积, 1 mL;

V1---加入样本体积, 0.02 mL;

V2---反应体系总体积, $2 \times 10^4 \text{ L}$;

T---反应时间, 5min;

500---细菌或细胞总数, 500 万。

W---样本质量, g;

Cpr---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。