

## 丙酮酸激酶 (Pyruvate kinase, PK) 试剂盒说明书

分光光度法 50 管/48 样

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, 也是产生 ATP 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。

### 组成:

产品名称	GC003-50T/48S	Storage
提取液: 液体	60ml	4°C
试剂一: 液体	50ml	4°C
试剂二: 粉剂	2 瓶	-20°C
试剂三: 液体	25 $\mu$ l $\times$ 2	4°C
说明书	一份	

### 自备仪器和用品:

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

### 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 ( $10^4$  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°C 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°C 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、样本测定

最终解释权所有 © 伊势久 (江苏连云港) 生物科技有限责任公司, 保留一切权利



伊势久(江苏连云港)生物科技有限责任公司

江苏省连云港市海州区花果山大道 17 号



服务热线: 0518-81263339

官网:<http://www.bio149.com>

(1) 试剂二的配制：临用前取试剂二一瓶，加入 22.5ml 试剂一和 2.65ml 蒸馏水充分溶解，置于 37°C（哺乳动物）或 25°C（其它物种）水浴 5min；现配现用。

(2) 试剂三的配制：临用前取试剂三支，加入 1.5ml 蒸馏水充分溶解待用；现配现用。

(3) 在 1ml 石英比色皿中加入 50 $\mu$ l 样本、50 $\mu$ l 试剂三和 900 $\mu$ l 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 $\Delta A=A1-A2$ 。

## 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。

