

## 丙酮酸激酶（PK）活性检测试剂盒（微量法）

产品货号：BA1062

产品规格：100管/96样

### 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<sup>+</sup>，在340nm下测定NADH下降速率，即可反映PK活性。

**注意：**实验之前建议选择2-3个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

### 产品内容：

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体100mL×1瓶	4℃
试剂一	液体20mL×1瓶	4℃
试剂二	粉剂×1支	-20℃
试剂三	液体20 μL×1瓶	4℃

### 溶液的配制：

1. 试剂二：临用前在试剂二瓶中加入17mL试剂一和1mL蒸馏水充分溶解，置于37℃（哺乳动物）或25℃（其他物种）水浴5分钟，现配现用；
2. 试剂三：液体置于试剂瓶内EP管中。临用前根据用量按照试剂三:蒸馏水为17:1000的体积比例充分混匀，冰上放置备用，现用现配。

### 所需的仪器和用品：

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/匀浆器、冰和蒸馏水。

### 操作步骤：

#### 一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

##### 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）样本：直接检测。

#### 二、测定步骤

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。



扫一扫 加微信

**上海尚宝生物科技有限公司**  
Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q：807961520

邮箱：saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

2. 样本测定：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2min 20s后的吸光值A2，计算  $\Delta A=A1-A2$ 。

## 二、PK活力单位的计算

### A. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下：

1. 按血清（浆）PK体积计算

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。

$$PK (U/mL) = [\Delta A \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 1608 \times \Delta A$$

2. 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。

$$PK (U/mg \text{ prot}) = [\Delta A \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T = 1608 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

3. 按样本质量计算

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。

$$PK (U/g \text{ 质量}) = [\Delta A \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1608 \times \Delta A \div W$$

4. 按细菌或细胞数量计算

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。

$$PK (U/10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 3.216 \times \Delta A$$

V反应：反应体系总体积， $2 \times 10^{-4}L$ ； $\epsilon$ ：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，0.01mL；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。

### B. 用96孔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1nmol NADH定义为一个酶活力单位。

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

2. 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。

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

3. 样本质量计算

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。

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

4. 按细菌或细胞数量计算

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。

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

V反应：反应体系总体积， $2 \times 10^{-4}L$ ； $\epsilon$ ：NADH摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3 L/mol/cm$ ；d：96孔板光径，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℃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。或酶标板放入37℃（哺乳动物）或25℃（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。



扫一扫 加微信

**上海尚宝生物科技有限公司**  
Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q：807961520

邮箱：saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com