

## Pyruvate Kinase (PK) Activity Assay Kit

### 丙酮酸激酶(PK)活性检测试剂盒 分光法

产品编号	产品名称	规格
BL1820A	丙酮酸激酶(PK)活性检测试剂盒 分光法	48T

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

#### 产品组成:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	60mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	20mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	粉末×1 瓶	-20°C保存	用前甩几下使试剂落入底部, 再加 11mL 的蒸馏水溶解。
试剂三	粉末×4 支	-20°C保存	每支用前甩几下使试剂落入底部, 再加 0.6mL 的蒸馏水溶解备用。用不完的试剂分装后-20°C保存, 禁止反复冻融, 三天内用完。
试剂四	粉末×1 支	-20°C保存	用前甩几下使试剂落入底部, 再加 2.2mL 的蒸馏水溶解备用。用不完的试剂分装后-20°C保存, 禁止反复冻融, 三天内用完。

#### 使用方法:

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!

##### 一、样本准备

###### 1. 组织样本:

(a) 称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆;

(b) 12000rpm, 4°C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. 细胞/细菌样本:

(a) 先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清;

(b) 取 5×10<sup>6</sup> 个细菌或细胞加入 1mL 提取液, 超声波破碎细菌或细胞 (冰浴, 功率 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次);

(c) 12000rpm 4°C离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 按照每 0.5~1×10<sup>7</sup> 个细菌/细胞加入 1mL 提取液进行提取。

###### 3. 血清样本:

直接检测。若浑浊, 离心后取上清检测。直接检测; 若浑浊, 离心后取上清检测。

##### 二、样品测定

1. 紫外分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 340nm, 蒸馏水调零。

2. 所有试剂可放在 37°C水浴 5-15min。

Note: For in vitro research use only, not for diagnostic or therapeutic use, This product is not a medical device.

注意: 在体外研究使用, 不用于诊断或治疗用途, 本产品不是医疗装置。



3. 在 1mL 石英比色皿（光径 1cm）中依次加入：

试剂名称（ $\mu\text{L}$ ）	测定管
样本	80
试剂一	360
试剂二	200
试剂三	40
混匀，37°C下，静置 10min 后	
试剂四	40
混匀，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  $\Delta A$  值小于 0.01，可适当延长反应时间 T（如由 5min 延至 15min 或更长读取 A2）。或适当加大样本量 V1（如由 80 $\mu\text{L}$  增至 160 $\mu\text{L}$ ，则试剂一相应减少）；或增加样本取样质量 W；则改变后的 T 和 V1 和 W 需代入公式重新计算。  
 2.若 A1 太大如超过 2（如颜色较深的植物叶片，一般色素较高，则起始值会偏高）可减少样本加样体积 V1（如减至 40 $\mu\text{L}$ ，则补充 40 $\mu\text{L}$  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  $\Delta A$  大于 0.6，可减少样本加样体积 V1（如减至 40 $\mu\text{L}$ ，则补充 40 $\mu\text{L}$  蒸馏水）或减少反应时间 T（如 2min），则改变后的 V1 和 T 代入公式重新算。  
 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。

### 三、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。

$$PK(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot})=[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (\text{Cpr} \times V1 \div V) \div T = 289.4 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

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。

$$PK(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重})=[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (\text{Cpr} \times V1 \div V) \div T = 289.4 \times \Delta A \div W$$

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。

$$PK(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell})=[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.579 \times \Delta A$$

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。

$$PK(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL})=[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div V1 \div T = 289.4 \times \Delta A$$

$\epsilon$ ---NADPH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3 \text{ L} / \text{mol} / \text{cm}$     d---1mL 石英比色皿，1cm

V---加入提取液体积，1 mL

V1---加入样本体积，0.08mL

V2---反应体系总体积， $7.2 \times 10^{-4} \text{ L}$

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

### 注意事项：

1. 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品。
2. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

### 有效期：

-20°C 保存六个月。

Note: For in vitro research use only, not for diagnostic or therapeutic use, This product is not a medical device.

注意：在体外研究使用，不用于诊断或治疗用途，本产品不是医疗装置。

