

## Pyruvate Kinase (PK) Activity Assay Kit

### 丙酮酸激酶(PK)活性检测试剂盒 微板法

产品编号	产品名称	规格
BL1820B	丙酮酸激酶(PK)活性检测试剂盒 微板法	96T

#### 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	120mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	10mL×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 5.5mL 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 0.55mL 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  $5 \times 10^6$  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  $0.5 \sim 1 \times 10^7$  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. 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 340nm。

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. 依次在 96 孔板中加入：

试剂名称 (μL)	测定管
样本	20
试剂一	90
试剂二	50
试剂三	20
混匀, 37°C下, 静置 10min 后	
试剂四	20
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 20μL 增至 40μL, 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 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  $\Delta A$  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 代入公式重新计算。  
 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。

### 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。

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

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。

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

$\epsilon$ ---NADPH 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, 0.02mL

$V2$ ---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, 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。

