



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

丙酮酸激酶(PK)活性检测试剂盒(可见分光光度法)

货号: R41778

规格: 50T

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
提取液ES07	60ml×1	2-8℃保存
R41778-A	45ml×1	2-8℃保存
R41778-B	粉剂×1支	-20℃保存
工作液的配制: 临用前将R41778-B转移至R41778-A中, 充分溶解备用, 现配现用。		
R41778-C	粉剂×1支	-20℃保存; 临用前每支加入1.5mL双蒸水充分溶解备用, 剩余试剂需2-8℃保存, 一周有效;
R41778-D	液体×1支	2-8℃保存; 临用前根据用量按照R41778-D: 蒸馏水为1:20的体积比例充分混匀, 冰上放置备用, 现用现配。

简介

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。

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⁺, 在 340nm 下测定 NADH 下降速率, 即可反映 PK 活性。

自备用品:

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。



样品处理（丙酮酸激酶提取）：

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 ES07 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 ES07），超声波破碎（冰浴，功率 20%或 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次），静置 30min，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 ES07 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 ES07），进行冰浴匀浆，静置 30min，8000g，4℃离心 10min，取上清待测。

3. 血清（浆）样品：直接检测。

测定步骤：

1. 分光光度计或酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 340nm，蒸馏水调零。
2. 工作液的配制：临用前将 R41778-B 转移至 R41778-A 中，充分溶解备用，现配现用。
3. 将工作液、R41778-C 置于 37℃（哺乳动物）或 25℃（其他物种）预热 10 分钟。
4. 按照下表操作：

试剂名称	测定管(ul)
工作液	900
R41778-C	30
R41778-D	15
待测样品	30

将上述试剂按顺序加入 1 mL 石英比色皿中，立即混匀，加样本的同时开始计时，在 340 nm 波长下记录 20 秒时的初始吸光度 A1，比色后迅速将比色皿连同反应液一起放入 37℃（哺乳动物）或25℃（其它物种）水浴中准确反应 2 分钟；迅速取出比色皿并擦干，340 nm 下比色，记录 2 分 20秒时的吸光度 A2，计算 $\Delta A=A1-A2$ 。

PK 活力单位的计算：



1. 血清（浆）PK 活力的计算:

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 1nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$PK (U/mg \text{ prot}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T = 2613 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

(2) 按样本鲜重计算:

单位的定义: 每 g 组织每分钟消耗 1nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$PK (U/g \text{ 鲜重}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 2613 \times \Delta A \div W$$

(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。

$$PK (U/10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 5.226 \times \Delta A$$

注: V 反总: 反应体系总体积, $9.75 \times 10^{-4} \text{L}$; ϵ : NADH 摩尔消光系数, $6.22 \times 10^3 \text{L/mol/cm}$; d: 比色皿光径, 1 cm; V 样: 加入样本体积, 0.03mL; 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 R41778-D、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°C 或 25°C, 取小烧杯一只装入一定量的 37°C 或 25°C 蒸馏水, 将此烧杯放入 37°C 或 25°C 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。

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。