



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(微量法)

货号: R41779

规格: 100T

有效期: 6个月

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
提取液ES07	100ml×1	4℃保存
R41779-A	20ml×1	4℃保存
R41779-B	粉剂×1支	-20℃保存
在R41779-B瓶中加入17mLR41779-A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。		
R41779-C	液体1支	4℃保存, 用前加入1mL蒸馏水充分溶解, 冰上放置备用, 现配现用。

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/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、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. 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。

2. 在微量石英比色皿或 96 孔板，按照下表操作：

试剂名称	测定管(ul)
样本	10
R41779-C	10
R41779-B	180
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 $\Delta A = A1 - A2$ 。	

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. 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。

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

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。

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

(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。

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

(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。

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

注: V 反总: 反应体系总体积, $2 \times 10^{-4}L$; ϵ : 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。

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

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。

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

(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。

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

(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 1nmolNADH 定义为一个酶活力单位。

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

注: $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, $2 \times 10^{-4} \text{L}$; ϵ : NADH 摩尔消光系数, $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$; d : 96 孔板光径, 0.6cm ; $V_{\text{样}}$: 加入样本体积, 0.01mL ; $V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积, 1mL ; T : 反应时间, 2min ; C_{pr} : 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 R41779-C、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。或酶标板放入 37°C (哺乳动物) 或 25°C (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。

源叶