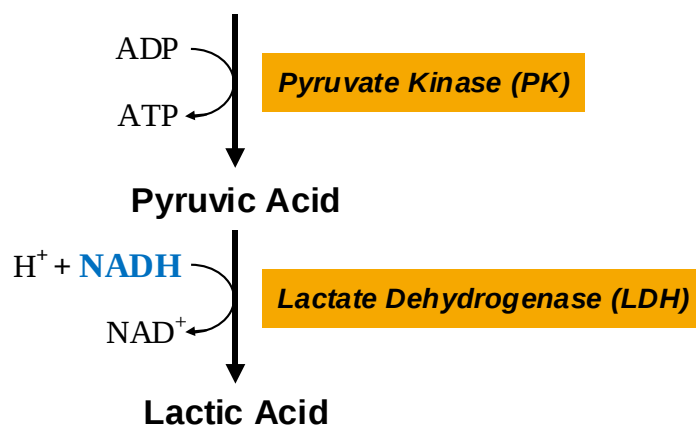




丙酮酸激酶 (PK) 活性检测试剂盒

Pyruvate Kinase (PK) Activity Assay Kit

Phosphoenolpyruvate (PEP)



北京盒子生工科技有限公司
Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.



丙酮酸激酶（PK）活性检测试剂盒

Pyruvate Kinase (PK) Activity Assay Kit

一、产品描述

丙酮酸激酶（PK）广泛存在于动物、植物、微生物和培养细胞中，是糖酵解过程中催化磷酸烯醇丙酮酸和 ADP 转变为丙酮酸和 ATP 的磷酸基转移酶，是该过程主要的限速酶之一，丙酮酸激酶活性测定对于细胞内糖酵解和信号传导途径分析及相关疾病的鉴定具有重要意义。

丙酮酸激酶可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丙酮酸和 NADH 生成乳酸和 NAD^+ ，NADH 在 340 nm 处具有特征吸收峰，通过测定吸光值的下降速率即可表征丙酮酸激酶的活性。

二、产品内容

名称		试剂规格	储存条件	使用说明及注意事项
提取液		液体 120 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂一		液体 30 μL ×1 支	4°C 保存	按照试剂一：蒸馏水=1:60 的体积比配置 (根据使用量现用现配，配置后冰上放置)
试剂二	组分 A	粉剂×1 瓶	-20°C 避光保存	使用前将组分 B 加入组分 A 中充分溶解 (可分装后-20°C 保存，避免反复冻融)
	组分 B	液体 25 mL×1 瓶	4°C 保存	

注：试剂一为微量试剂，建议低转速适当离心并吹吸混匀后使用。

三、产品使用说明

测定过程中所需要的仪器和试剂：紫外分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔 UV 板、研钵/匀浆器、可调式移液器/多道移液器、台式离心机、恒温水浴/培养箱和蒸馏水。

1. 粗酶液的制备（可根据预实验结果适当调整样本量及比例）

①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 0.1 g 组织，加入 1 mL 提取液）处理样品，冰浴匀浆，4°C 8000 g 离心 10 min，取上清置于冰上待测。

②细菌或细胞：离心收集细菌或细胞至离心管内，按照细菌或细胞数量（ 10^4 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 1 mL 提取液）处理样品，冰浴超声破碎（功率 20% 或 200 W，超声 3 s，间隔 10 s，重复 30 次），4°C 8000 g 离心 10 min，取上清置于冰上待测。

③血清（浆）、培养液等液体样本：直接检测或适当稀释后再进行检测。

2.测定步骤

- ①紫外分光光度计/酶标仪预热 30 min 以上，调节波长至 340 nm，蒸馏水调零。
- ②使用前将**试剂二**恢复至室温后置于 37°C（哺乳动物）或 25°C（其他物种）预热 10 min。
- ③在 96 孔 UV 板或微量石英比色皿中依次加入下列试剂：

试剂	测定组 (μL)
粗酶液	10
试剂一	10
试剂二	180

- 吸光值测定：**①立即充分混匀并开始计时，测定 20 s（总时间）时 340 nm 处吸光值，记为 A1；
 ②37°C（哺乳动物）或 25°C（其它物种）准确反应 120 s，测定 140 s（总时间）时 340 nm 处吸光值，记为 A2；③计算 $\Delta A = A1 - A2$ 。

3.丙酮酸激酶（PK）活性计算

3.1 使用 96 孔 UV 板测定的计算公式

①按组织蛋白浓度计算

单位定义：每 mg 组织蛋白每分钟消耗 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{PK (U/mg prot)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times 10^9}{\epsilon \times d_1 \times \text{Cpr} \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{3215.4 \times \Delta A}{\text{Cpr}}$$

②按组织样本质量计算

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

$$\text{PK (U/g)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{样总}} \times 10^9}{\epsilon \times d_1 \times W \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{3215.4 \times \Delta A}{W}$$

③按细菌或细胞数量计算

单位定义：每 10^4 个细菌或细胞每分钟消耗 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{PK (U/10}^4 \text{ cell)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{样总}} \times 10^9}{\epsilon \times d_1 \times \text{细菌或细胞数量} \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{3215.4 \times \Delta A}{\text{细菌或细胞数量}}$$

④按液体样本体积计算

单位定义：每 mL 液体样本每分钟消耗 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{PK (U/mL)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times 10^9}{\epsilon \times d_1 \times V_{\text{样}} \times T} = 3215.4 \times \Delta A$$

3.2 使用微量石英比色皿测定的计算公式

①按组织蛋白浓度计算

单位定义：每 mg 组织蛋白每分钟消耗 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{PK (U/mg prot)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times 10^9}{\epsilon \times d_2 \times \text{Cpr} \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{1607.7 \times \Delta A}{\text{Cpr}}$$

②按组织样本质量计算

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

$$\text{PK (U/g)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{样总}} \times 10^9}{\epsilon \times d_2 \times W \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{1607.7 \times \Delta A}{W}$$

③按细菌或细胞数量计算

单位定义：每 10^4 个细菌或细胞每分钟消耗 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{PK (U/10}^4 \text{ cell)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{样总}} \times 10^9}{\epsilon \times d_2 \times \text{细菌或细胞数量} \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{1607.7 \times \Delta A}{\text{细菌或细胞数量}}$$

④按液体样本体积计算

单位定义：每 mL 液体样本每分钟消耗 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{PK (U/mL)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times 10^9}{\epsilon \times d_2 \times V_{\text{样}} \times T} = 1607.7 \times \Delta A$$

注释： V 样：反应体系中加入粗酶液的体积，0.01 mL；V 样总：粗酶液总体积，1 mL；V 反总：反应体系总体积， 2×10^{-4} L； ϵ ：NADH 摩尔消光系数， 6.22×10^3 L/mol/cm； d_1 ：96 孔 UV 板光径，0.5 cm； d_2 ：微量石英比色皿光径，1.0 cm；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；W：样本质量，g；细菌或细胞数量，以万计；T：反应时间，2 min。

四、注意事项

- ①测定过程中试剂一和粗酶液均需在冰上放置，以免变性和失活；
- ②准确在 20 s 和 140 s 处完成测定，以保证实验结果的准确性；若使用 96 孔 UV 板进行测定，需使用多道移液器且分批进行检测，以确保组间反应时间一致；
- ③若 ΔA 大于 0.4，建议将粗酶液使用提取液适当稀释后再进行测定；若 ΔA 小于 0.05，建议增加样本量重新制备粗酶液后再进行测定，计算时相应修改；
- ④反应温度应保持 37°C（哺乳动物）或 25°C（其它物种），96 孔 UV 板可放入恒温培养箱保温；
- ⑤为保证结果准确且避免试剂损失，测定前请仔细阅读说明书（以实际收到说明书内容为准），确认试剂储存和准备是否充分，操作步骤是否清楚，且务必取 2-3 个预期差异较大的样本进行预测定，过程中问题请您及时与工作人员联系。

For Research Use Only. Not for Use in Diagnostic Procedures.

