

丙酮酸激酶(PK)试剂盒

- 【产品简介】 ◆丙酮酸激酶(PK, EC2. 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⁺, 在340nm下测定NADH下降速率, 即可反映PK活性。

【货 号】 TMC017

【规 格】 96T

【包装清单】

试剂名称	规格	保存条件	
提取液	液体120mL×1瓶	4℃	
试剂一	液体10mL×1瓶	4℃	
试剂二	粉剂mg×1瓶	-20℃	临用前甩几下或离心, 使粉剂落入底部, 再加5.5mL蒸馏水备用。
试剂三	粉剂mg×4支	-20℃	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℃保存, 禁止反复冻融, 三天内用完。
试剂四	粉剂mg×支	-20℃	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℃保存, 禁止反复冻融, 三天内用完。

【保存条件】 4℃保存, 有效期一年。

【操作步骤】 1、样本制备：

①组织样本：

称取约0.1g组织加入研钵中，加入1mL提取液，进行冰浴匀浆，12000rpm，4℃离心10min，取上清液，置冰上待测。

注：也可以按照组织质量(g)：提取液体积(mL)为1:5~10的比例提取。

②细菌/真菌样本：

先收集细菌或细胞到离心管内，离心弃上清；取500万细菌或细胞加入1mL提取液；冰浴超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率20%或200W，超声3S，间隔10S，重复30次）；12000rpm，4℃离心10min，取上清液，置冰上待测。

注：也可按照细菌或细胞数量(10⁴个)：提取液体积(mL)为1000~5000:1的比例进行提取。

③血清样本：直接检测，若浑浊则离心后取上清检测。

2、上机检测：

①酶标仪预热30 min 以上，调节波长到340nm。

②所有试剂可放在37℃条件下水浴5-15min。

③试剂一和二和三可按照90:50:20比例配成混合液（一枪加160uL该混合液）（该混合液用多少配多少，现配现用）。

④在96孔板中依次加入：

试剂名称(uL)	测定管
样本	20
试剂一	90
试剂二	50
试剂三	20
混匀，37℃下孵育10min后	
试剂四	20
混匀，37℃下，10s时于340nm处读取吸光值A1，5min后读取吸光值A2， $\Delta A = A1 - A2$ 。	

3、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。

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

$$= 643.1 \times \Delta A \div Cpr$$

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。

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

$$= 643.1 \times \Delta A \div W$$

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。

$$PK(nmol/min/10^4 cell)=[\Delta A+(\varepsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V) \div T=1.29 \times \Delta A$$

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。

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

ε ---NADH摩尔消光系数, $6.22 \times 10^3 L/mol/cm$; 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, 2×10^{-4} ;

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。