

丙酮酸激酶（PK）检测试剂盒（微量法）

货号：PMK1121

保存：-20℃避光保存 12 个月

规格：48T/96T

适用样本：血清（浆）、动植物组织、细胞、细菌

产品简介

丙酮酸激酶（Pyruvate Kinase, 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。本试剂盒提供了一种简单的检测方法，用于检测生物样本中 PK 的活性。其原理是 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⁺，NADH 在 340nm 有特征吸收峰，而 NAD⁺没有，通过测定 340nm 光吸收下降速率，即可反映 PK 活性。

产品内容

试剂盒组分	规格		储存条件
	48T	96T	
提取液	50mL	100mL	4℃ 保存
试剂一	10mL	20mL	4℃ 保存
试剂二	1	1	-20℃ 保存
试剂三	1	1	-20℃ 保存

自备耗材

酶标仪或紫外分光光度计（能测 340nm 处的吸光度）及水浴锅

96 孔 UV 板或微量石英比色皿、可调节式移液枪及枪头

低温离心机、制冰机

去离子水

匀浆器（如果是组织样本）

试剂准备

注意：各组分（小管试剂）开盖前，请先低速离心。

提取液：即用型；使用前，平衡到室温；4℃ 保存。

试剂一：即用型；使用前，平衡到室温；4℃ 保存。

试剂二：临用前配制，48T 的试剂二瓶中加入 8.5mL 试剂一和 0.5mL 去离子水充分溶解，在 96T 的试剂二瓶中加入 17mL 试剂一和 1mL 去离子水充分溶解；溶解以后分装-20℃ 保存，避免反复冻融。

试剂三：临用前配制，在 48T 的试剂三中加入 0.5mL 去离子水充分混匀，在 96T 的试剂三中加入 1mL 去离子水充分混匀，冰上放置备用；溶解以后的试剂分装-20℃ 保存，避免反复冻融。

样本制备

动植物组织样本：称取约 0.1g 样本，加入 1mL 提取液，冰浴匀浆，8,000g，4℃ 离心 10min，取上清液，置冰上待测。

细胞、细菌：收集 500 万细胞或细菌到离心管内，用冷 PBS 清洗细胞或细菌，离心后弃上清，加入 1mL 提取液，冰浴超声波破碎细胞或细菌 5min（功率 20%或 200W，超声 3s，间隔 7s，重复 30 次），然后 8,000g，4℃ 离心 10min，取上清液，置冰上待测。

血清等液体样本：直接测定，根据预实验结果确定稀释倍数。

产品说明书

- 注意：1. 推荐使用新鲜样本，如果不立即进行实验，样本可在-80℃保存1个月。如需测定蛋白浓度，推荐使用BCA法蛋白质定量试剂盒进行样本蛋白质浓度测定。
2. 对于脂肪含量较高的动物组织，离心后移除上层脂肪，再取上清液。

实验步骤

1. 酶标仪或紫外分光光度计预热30min以上，调节波长至340nm，紫外分光光度计去离子水调零。
2. 试剂二置于25℃（一般物种）或者37℃（哺乳动物）孵育5min。
3. 样本测定：在96孔UV微孔板或微量石英比色皿中加入10μL样本，10μL试剂三和180μL试剂二，迅速混匀。用酶标仪在340nm下测定20s时的吸光值 A_1 和2min 20s后的吸光值 A_2 ，计算 $\Delta A=A_1-A_2$ 。

注意：实验之前建议选择2-3个预期差异大的样本做预实验。如果 ΔA 小于0.001可适当加大样本量。如果 ΔA 大于1.0，样本可用提取液进一步稀释，计算结果乘以稀释倍数，或减少提取用样本量。

结果计算

A. 使用96孔UV板测定的计算公式如下

1. 血清（浆）等液体样本中PK活力的计算：

单位的定义：每mL液体样本在反应体系中每分钟消耗1nmol的NADH定义为一个酶活力单位。

$$PK(U/mL) = [\Delta A \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 3215 \times \Delta A$$

2. 组织、细菌或细胞中PK活力的计算：

3. （1）按样本蛋白浓度计算：

单位的定义：每mg组织蛋白在反应体系中每分钟消耗1nmol的NADH定义为一个酶活力单位。

$$PK(U/mg \text{ prot}) = [\Delta A \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (Cpr \times V_{\text{样}}) \div T = 3215 \times \Delta A \div Cpr$$

（2）按样本鲜重计算：

单位的定义：每g组织在反应体系中每分钟消耗1nmol的NADH定义为一个酶活力单位。

$$PK(U/g \text{ 鲜重}) = [\Delta A \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T = 3215 \times \Delta A \div W$$

（3）按细菌或细胞密度计算：

单位的定义：每 10^4 个细菌或细胞在反应体系中每分钟消耗1nmol的NADH定义为一个酶活力单位。

$$PK(U/10^4 \text{ Cells}) = [\Delta A \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times 500) \div T = 3215 \times \Delta A \div 500 = 6.431 \times \Delta A$$

$V_{\text{反应}}$ ：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 ：96孔板光径，0.5cm； 10^9 ：1 mol = 1×10^9 nmol； $V_{\text{样}}$ ：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； Cpr ：样本蛋白质浓度，mg/mL； W ：样品质量，g；500：细菌或细胞总数， 5×10^6 。

B. 使用微量石英比色皿测定的计算公式

将上述计算公式中光径 d ：0.5cm调整为 d ：1cm进行计算即可。

注意事项

1. 实验过程中请穿戴实验服、口罩和乳胶手套。请按照生物实验室的国家安全规定进行实验，尤其是在检测血样或其他体液时。
2. 本试剂盒仅用于实验室科学研究，如果本试剂盒用于临床诊断或任何其他用途，我们将不对任何后果负责。
3. 本试剂盒应在有效期内使用，并请严格按照说明书进行存储。
4. 不同批次号、不同厂家之间的组分不要混用；否则，可能导致结果异常。
5. 勤换吸头，避免各组分之间的交叉污染。

相关产品：

PMK1116 丙酮酸（PA）检测试剂盒（微量法）

PMK1120 己糖激酶（HK）检测试剂盒（微量法）

PMK1122 磷酸果糖激酶（PFK）检测试剂盒（微量法）

PMK1123 磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶（PEPC）检测试剂盒（微量法）

更多产品详情了解，请关注公众号：

