

丙酮酸激酶 (Pyruvate kinase, PK) 试剂盒说明书

分光光度法 50 管/48 样

注 意：正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义：

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。

测定原理：

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。

需自备的仪器和用品：

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

试剂的组成和配制：

提取液：60mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂一：液体 50mL×1 瓶，4℃ 保存；；

试剂二：粉剂×2 瓶，-20℃ 保存；

试剂三：液体 25 μL×2 支，4℃ 保存；

样本的前处理：

- 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（10⁴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 1mL 提取液），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）；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），进行冰浴匀浆。8000g 4℃ 离心 10min，取上清，置冰上待测。
- 3、血清（浆）样品：直接检测。

测定步骤：

- 1、分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 340nm，蒸馏水调零。
- 2、样本测定
 - （1）试剂二的配制：临用前取试剂二一瓶，加入 22.5mL 试剂一和 2.65mL 蒸馏水充分溶解，置于 37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）水浴 5min；现配现用。
 - （2）试剂三的配制：临用前取试剂三一支，加入 1.5mL 蒸馏水充分溶解待用；现配现用。
 - （3）在 1mL 石英比色皿中加入 50 μL 样本、50 μL 试剂三和 900 μL 试剂二，混匀，立即记录 340nm 处 20s 时的吸光值 A1 和 2min20s 后的吸光值 A2，计算 $\Delta A=A1-A2$ 。

PK 活性计算:

1、血清（浆）中 PK 活力的计算:

单位的定义：每毫升血清（浆）每分钟消耗 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$PK \text{ (nmol/min/mL)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 2613 \times \Delta A$$

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 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

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

(2) 按样本鲜重计算:

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

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

(3) 按细菌或细胞密度计算:

单位的定义：每 1 万个细菌或细胞每分钟消耗 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

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

V 反总：反应体系总体积， 9.75×10^{-4} L； ϵ ：NADH 摩尔消光系数， 6.22×10^3 L / mol / cm；d：比色皿光径，1cm；V 样：加入样本体积，0.03 mL；V 样总：加入提取液体积，1 mL；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。