

## 丙酮酸激酶 (Pyruvate kinase, PK) 试剂盒说明书

微量法 100 管/96 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  $\text{NAD}^+$ ，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/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、研钵、冰和蒸馏水

### 试剂的组成和配制：

提取液：100mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂一：液体 20mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂二：粉剂×2 瓶，-20℃ 保存；

试剂三：液体 10  $\mu\text{L}$ ×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 ( $10^4$  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 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、分光光度计或酶标仪预热 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 9mL 试剂一和 1.06mL 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：临用前取试剂三支，加入 0.6mL 蒸馏水充分溶解待用；现配现用。

(3) 在微量石英比色皿或 96 孔板中加入 10  $\mu\text{L}$  样本、10  $\mu\text{L}$  试剂三和 180  $\mu\text{L}$  试剂二，混匀，立即记录 340nm 处 20s 时的吸光值  $A_1$  和 2min20s 后的吸光值  $A_2$ ，计算  $\Delta A = A_1 - A_2$ 。

### PK 活性计算：

a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

**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。

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

**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 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

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

**(2) 按样本鲜重计算:**

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

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

**(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。

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

V 反总：反应体系总体积， $2 \times 10^{-4}$  L； $\epsilon$ ：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，0.01 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。

**b. 用 96 孔板测定的计算公式如下**
**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。

$$PK \text{ (nmol/min /mL)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V \text{ 样} \div T = 3216 \times \Delta A$$

**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。

$$PK \text{ (nmol/min /mg prot)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V \text{ 样} \times Cpr) \div T = 3216 \times \Delta A \div Cpr$$

**(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。

$$PK \text{ (nmol/min /g 鲜重)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 3216 \times \Delta A \div W$$

**(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。

$$PK \text{ (nmol/min /10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 6.432 \times \Delta A$$

V 反总：反应体系总体积， $2 \times 10^{-4}$  L； $\epsilon$ ：NADH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3$  L / mol /cm；d：96 孔板光径，0.5cm；V 样：加入样本体积，0.01 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。