



## 丙酮酸激酶（PK）活性检测试剂盒说明书

微量法

**注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。**

货号：BC0545

规格：100T/96S

**产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。**

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 110 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 20 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二 A	粉剂×1 支	-20℃保存
试剂二 B	粉剂×2 支	-20℃保存
试剂二 C	粉剂×1 支	-20℃保存
试剂三	液体 20μL×1 支	2-8℃保存

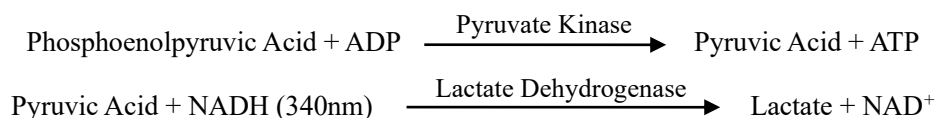
溶液的配制：

- 1、试剂二 A：临用前加入 1.2mL 蒸馏水，用不完的试剂可-20℃分装保存 4 周，避免反复冻融；
- 2、试剂二 B：临用前取 1 支加入 0.645mL 蒸馏水，用不完的试剂可-20℃分装保存 4 周，避免反复冻融；
- 3、试剂二 C：临用前加入 1.2mL 蒸馏水，用不完的试剂可-20℃分装保存 4 周，避免反复冻融；
- 4、工作液的配制：根据样本按试剂一：试剂二 A：试剂二 B：试剂二 C= 750μL：50μL：50μL：50μL（5T）的比例配制，现用现配；
- 5、试剂三：临用前根据用量按照试剂三:蒸馏水=5μL:295μL（30T）的比例充分混匀，冰上放置备用，现用现配。

**产品说明：**

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。

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<sup>+</sup>，在340nm下测定NADH下降速率，即可反映PK活性。



**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。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。**

**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/恒温培养箱、可调式移液器、微量石英比色皿/96孔UV板、研钵/匀浆器/细胞超声破碎仪、冰和蒸馏水。

**操作步骤：**

## 一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

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 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；8000g 4°C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°C离心 10min，取上清，置冰上待测。
3. 血清（浆）等其他液体：直接检测。若有沉淀请离心后取上清待测。

## 二、测定步骤

- 1、紫外分光光度计/酶标仪预热30min以上，调节波长至340nm，分光光度计蒸馏水调零。
- 2、工作液临用前于37°C预热10min。
- 3、加样表：

试剂名称（ $\mu\text{L}$ ）	测定管
样本	10
试剂三	10
工作液	180

将上述试剂按顺序加入微量石英比色皿或96孔UV板中，立即充分混匀后于340nm处测定20s时的吸光值A1，迅速置于37°C准确反应2min（酶标仪有控温功能可将温度调至37°C），拿出迅速擦干测定2min20s时的吸光值A2。计算 $\Delta A = A1 - A2$ 。

## 三、PK 活性计算

### A. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下：

#### 1、按液体体积计算

单位的定义：每毫升液体每分钟消耗1nmol NADH定义为一个酶活力单位。

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

#### 2、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1nmol NADH定义为一个酶活力单位。

$$\text{PK活性 (U/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T = 1608 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

#### 3、按样本质量计算

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

$$\text{PK活性 (U/g 质量)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1608 \times \Delta A \div W$$

#### 4、按细菌或细胞数量计算

单位的定义：每 1 万个细菌或细胞在反应体系中每分钟消耗1nmol NADH定义为一个酶活力单位。

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

V反总：反应体系总体积， $2 \times 10^{-4}\text{L}$ ； $\epsilon$ ：NADH摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3\text{L/mol/cm}$ ；d：比色皿光径，1 cm；V样：加入样本体积，0.01mL；V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：样本质量，g；500：细菌或细胞总数，500万。

### B. 用96孔UV板测定的计算公式如下：

#### 1、按液体体积的计算

单位的定义：每毫升液体每分钟消耗1nmol NADH定义为一个酶活力单位。

PK活性 (U/mL) =  $[\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 2680 \times \Delta A$

## 2、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1nmol NADH定义为一个酶活力单位。

PK活性 (U/mg prot) =  $[\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T = 2680 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$

## 3、按样本质量计算

单位的定义：每g组织每分钟消耗1nmol NADH定义为一个酶活力单位。

PK活性 (U/g 质量) =  $[\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 2680 \times \Delta A \div W$

## 4、按细菌或细胞数量计算

单位的定义：每1万个细菌或细胞在反应体系中每分钟消耗1nmolNADH定义为一个酶活力单位。

PK活性 (U/10<sup>4</sup> cell) =  $[\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (N \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 2680 \times \Delta A \div N$

V反总：反应体系总体积，2×10<sup>-4</sup>L；ε：NADH摩尔消光系数，6.22×10<sup>3</sup>L/mol/cm；d：96孔板光径，0.6cm；V样：加入样本体积，0.01mL；V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：样本质量，g；N：细菌或细胞总数，以万计。

### 注意事项：

1. 测定过程中试剂三、样本在冰上放置，以免变性和失活。
2. 比色皿中反应液的温度尽量保持37°C，取小烧杯一只装入一定量的37°C蒸馏水，将此烧杯放入37°C水浴锅中。在反应过程中把比色皿连同反应液放在此烧杯中。或酶标板放入37°C恒温培养箱中孵育。
3. 最好两个人同时做此实验，一个人比色，一个人计时，以保证实验结果的准确性。

### 实验实例：

1. 称取约0.1g 鼠肝，加入1mL提取液，进行冰浴匀浆，8000g，4°C离心10min，取上清置冰上待测。之后按照测定步骤操作，用1mL微量石英比色皿测得计算A1=0.726，A2=0.243，ΔA=A1-A2=0.483，计算丙酮酸激酶活性得：

PK活性 (U/g 质量) =  $2680 \times \Delta A \div W = 12944.4 \text{ U/g 质量}$

### 相关发表文献：

[1] Liu Y, Liang X, Zhang G, et al. Galangin and pinocembrin from propolis ameliorate insulin resistance in HepG2 cells via regulating Akt/mTOR signaling[J]. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2018, 2018.

[2] Zhou F, Du J, Wang J. Albendazole inhibits HIF-1α-dependent glycolysis and VEGF expression in non-small cell lung cancer cells[J]. Molecular and cellular biochemistry, 2017, 428(1-2): 171-178.

### 参考文献：

[1] Lepper T W, Oliveira E, Koch G D W, et al. Lead inhibits in vitro creatine kinase and pyruvate kinase activity in brain cortex of rats[J]. Toxicology in Vitro, 2010, 24(3): 1045-1051.

### 相关系列产品：

BC0740/BC0745 己糖激酶（HK）活性检测试剂盒

BC2200/BC2205 丙酮酸（PA）含量检测试剂盒

BC0530/BC0535 磷酸果糖激酶（PFK）活性检测试剂盒