

丙酮酸激酶 (PK) 活性检测试剂盒 (微量法)

产品货号: BA1062

产品规格: 100管/96样

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⁺, 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。

产品内容:

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体100mL×1瓶	4℃
试剂一	液体20mL×1瓶	4℃
试剂二	粉剂×1支	-20℃
试剂三	液体20 μ L×1瓶	4℃

溶液的配制:

1. 试剂二: 临用前在试剂二瓶中加入17mL试剂一和1mL蒸馏水充分溶解, 置于37℃ (哺乳动物) 或25℃ (其他物种) 水浴5分钟, 现配现用;
2. 试剂三: 液体置于试剂瓶内EP管中。临用前根据用量按照试剂三:蒸馏水为17:1000的体积比例充分混匀, 冰上放置备用, 现用现配。

所需的仪器和用品:

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 (UV板)、研钵/匀浆器、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20%或者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) 样本: 直接检测。

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, 蒸馏水调零。

2. 样本测定: 在微量石英比色皿或96孔板中加入10 μ L样本、10 μ L试剂三和180 μ L试剂二, 混匀, 立即记录



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com

340nm处20s时的吸光值A1和2min 20s后的吸光值A2，计算 $\Delta A=A1-A2$ 。

二、PK活力单位的计算

A. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下：

1. 按血清（浆）PK体积计算

单位的定义：每毫升血清（浆）在反应体系中每分钟消耗1nmol NADH定义为一个酶活力单位。

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

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。

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

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。

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

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。

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

V反总：反应体系总体积， 2×10^{-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，0.01mL；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孔板测定的计算公式如下：

1. 血清（浆）PK活力的计算

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

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

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。

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

3. 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。

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

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1nmol NADH定义为一个酶活力单位。

$$PK(U/10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 5.36 \times \Delta A$$

V反总：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，0.6cm；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；500：细菌或细胞总数，500万。

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或25°C，取小烧杯一只装入一定量的37°C或25°C蒸馏水，将此烧杯放入37°C或25°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（哺乳动物）或25°C（其它物种）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。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

QQ：807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com