

丙酮酸激酶（PK）活性检测试剂盒（紫外分光光度法）

产品货号：BA1061

产品规格：50管/48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60mL×1瓶	4℃
试剂一	液体45mL×1瓶	4℃
试剂二	粉剂×1支	-20℃
试剂三	粉剂×1支	-20℃
试剂四	液体50 μL×1瓶	4℃

溶液的配制：

1. 试剂三：临用前每支加入1.5mL双蒸水充分溶解备用，用不完的试剂仍4℃保存一周；
2. 试剂四：液体置于试剂瓶内EP管中。临用前根据用量按照试剂四:蒸馏水为1:20的体积比例充分混匀，冰上放置备用，现用现配；
3. 工作液的配置：临用前将试剂二转移至试剂一中，充分溶解待用，现配现用。

所需的仪器和用品：

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/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（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. 分光光度计预热30min以上，调节波长至340nm，蒸馏水调零。
2. 将工作液、试剂三置于37℃（哺乳动物）或25℃（其他物种）预热10分钟。



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

3. 加样表:

试剂名称 (μL)	测定管
工作液	900
试剂三	30
试剂四	15
样本	30

将上述试剂按顺序加入1mL石英比色皿中，立即混匀，加样本的同时开始计时，在340nm波长下记录20秒时的初始吸光度A1，比色后迅速将比色皿连同反应液一起放入37℃（哺乳动物）或25℃（其它物种）水浴中准确反应2分钟；迅速取出比色皿并擦干，340nm下比色，记录2分20秒时的吸光度A2，计算 $\Delta A = A_1 - A_2$ 。

二、PK活力单位的计算

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。

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

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。

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

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。

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

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。

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

V反总：反应体系总体积， $9.75 \times 10^{-4} \text{L}$ ； ϵ ：NADH摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3 \text{L/mol/cm}$ ；d：比色皿光径，1cm；V样：加入样本体积，0.03mL；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. 测定过程中试剂四、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℃或25℃，取小烧杯一只装入一定量的37℃或25℃蒸馏水，将此烧杯放入37℃或25℃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。
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

Q Q: 807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com