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 25μL×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 50μL 样本、50μL 试剂三和 900μL 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 ΔA=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（nmol/min/mL）＝[ΔA×V 反总÷（ε×d）×10^9]÷V 样÷T=2613×ΔA

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（nmol/min /mg prot）＝[ΔA×V 反总÷（ε×d）×10^9]÷(V 样×Cpr) ÷T=2613×ΔA÷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（nmol/min /g 鲜重）＝[ΔA×V 反总÷（ε×d）×10^9]÷(W× V 样÷V 样总)÷T=2613×ΔA÷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（nmol/min /10^4 cell）＝[ΔA×V 反总÷（ε×d）×10^9]÷(500×V 样÷V 样总)÷T=5.226×ΔA

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。