

丙酮酸激酶（PK）检测试剂盒（微量法）

注意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

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。

试剂组成和配制：

提取液：液体 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 10μL×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（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 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 10μL 样本、10μL 试剂三和 180μL 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 $\Delta A = A1 - A2$ 。

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。

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

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。

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

(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。

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

(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。

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

V 反总: 反应体系总体积, 2×10^{-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, 0.01 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。

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

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。

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

(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。

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

(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。

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

V 反总: 反应体系总体积, 2×10^{-4} L;

ϵ : NADH 摩尔消光系数, 6.22×10^3 L / mol / cm;

d: 96 孔板光径, 0.5cm;

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。