



丙酮酸激酶（PK）活性检测试剂盒说明书

紫外分光光度法

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：BC0540

规格：50T/48S

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 60 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂一	液体 50 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂二 A	粉剂×1 支	-20°C保存
试剂二 B	粉剂×2 支	-20°C保存
试剂三	粉剂×1 支	-20°C保存
试剂四	液体 45μL×1 支	2-8°C保存

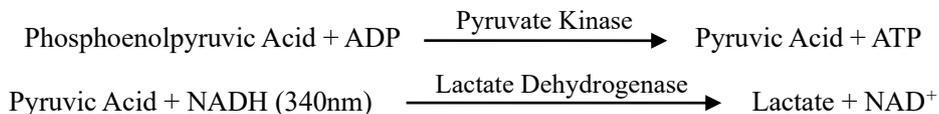
溶液的配制：

- 1、试剂二 A：临用前加入 1.2mL 蒸馏水溶解，用不完的试剂可 -20°C 分装保存 4 周，避免反复冻融；
- 2、试剂二 B：临用前取一支加入 0.7mL 蒸馏水溶解，用不完的试剂可 -20°C 分装保存 4 周，避免反复冻融；
- 3、试剂三：临用前加入 1.8mL 蒸馏水充分溶解，用不完的试剂可 -20°C 分装保存 4 周，避免反复冻融；
- 4、试剂四：临用前根据用量按照试剂四：蒸馏水=5μL:100μL（7T）的体积比例充分混匀，冰上放置备用，现用现配；
- 5、工作液的配制：按试剂一：试剂二 A：试剂二 B = 860μL：20μL：20μL（1T）的比例配制，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⁺，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、台式离心机、水浴锅/恒温培养箱、可调式移液器、1mL 石英比色皿、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. 分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 340nm，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（ 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 1 mL 石英比色皿中，立即混匀，加样本的同时开始计时，在 340 nm 波长下记录 20 秒时的初始吸光度 A_1 ，比色后迅速将比色皿连同反应液一起放入 37°C水浴中准确反应 2 分钟；迅速取出比色皿并擦干，340 nm 下比色，记录 2 分 20 秒时的吸光度 A_2 ，计算 $\Delta A = A_1 - A_2$ 。

三、PK 活性的计算

1. 按液体体积计算

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。

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

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。

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

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。

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

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。

$$\text{PK活性 (U/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (N \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 2613 \times \Delta A \div N$$

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，1 cm；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；N：细菌或细胞总数，以万计。

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°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。
- 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 兔心,加入1mL提取液,进行冰浴匀浆,8000g,4°C离心10min,取上清用提取液稀释16倍后置冰上待测。之后按照测定步骤操作,用1mL石英比色皿测得计算 $A_1=0.690$, $A_2=0.369$, $\Delta A=A_1-A_2=0.321$,计算丙酮酸激酶活性得:
PK活性 (U/g 质量) = $2613 \times \Delta A \div W \times 16$ (稀释倍数) = 134203.68 U/g 质量
2. 取30 μ L牛血清直接进行检测,用1mL石英比色皿测得计算 $A_1=0.785$, $A_2=0.658$, $\Delta A=A_1-A_2=0.127$,计算丙酮酸激酶活性得:
PK活性 (U/mL) = $2613 \times \Delta A$ = 331.851 U/mL
3. 称取约0.1g 绿萝叶片,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石英比色皿测得计算 $A_1=0.866$, $A_2=0.853$, $\Delta A=A_1-A_2=0.013$,计算丙酮酸激酶活性得:
PK活性 (U/g 质量) = $2613 \times \Delta A \div W$ = 336.69 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-1 α -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