

丙酮酸激酶 (PK) 测试盒说明书

(货号: A076-1-1 紫外比色法 50 管/48 样)

免责声明: 测试前请仔细阅读说明书, 预试后再进行批量实验, 否则由此导致的后果用户自行承担!

一、测定原理:

丙酮酸激酶 (pyruvate kinase, PK) 在 ADP 存在下可催化 PEP 产生丙酮酸, 丙酮酸再由 LDH 将其转变为乳酸, 同时将 NADH 变为 NAD。

二、试剂盒组成与试剂配制: (试剂盒有效期 6 个月)

试剂一: 液体 60mL×1 瓶, 4℃ 保存。

试剂二: 粉剂×2 支, -20℃ 保存, 每支用时加蒸馏水 1.4mL 溶解, 用不完放 -20℃ 以下保存 3~7 天。(如果你的样本数量少, 可以将配好的 1.4mL 再分成 2~3 管放 -20℃ 以下保存, 每次取一管用, 以免反复冻融)

试剂三: 液体×4 支, 4℃ 保存, 不可冷冻, 用不完的仍放 4~8℃ 保存。

试剂四: 粉剂×4 支, -20℃ 保存, 用时每支加蒸馏水 320μL 溶解, 用不完放 -20℃ 以下保存 (避免反复冻融)。

试剂五: 粉剂×4 支, -20℃ 保存, 用时每支加蒸馏水 650μL 溶解, 用不完放 -20℃ 以下保存 (避免反复冻融)。

三、所需仪器及试剂:

紫外分光光度计及 0.5cm 光径石英比色皿, 37℃ 水浴锅, 涡旋混匀器, 蒸馏水, 蛋白测定试剂 (组织样本用, 本公司有售)。

四、操作过程:

1、样本前处理:

①、**血清(浆)样本:** 直接使用。

②、**组织样本:** 称取组织重量, 按重量 (g): 体积 (mL) = 1:9 的比例, 加入 9 倍体积的生理盐水, 冰水浴条件下匀浆, 制成 10% 匀浆, 4000 转/分, 离心 10 分钟, 取上清再用生理盐水稀释成适当浓度匀浆上清待测 (请做 1~2 个浓度的预试验, 选择 ΔA 在 0.2 以内对应的样本最小稀释倍数)。(该上清液需测蛋白浓度, 蛋白定量试剂盒本公司有售)

③、**细胞样本:** 收集细胞后, 每份细胞 (细胞数量尽量不要低于 10⁶ 个, 越多越好) 加入 0.3mL 的生理盐水 (或者 PBS), 冰水浴下超声破碎 (功率 200-300W, 运行 5 秒, 间隔 15 秒, 反复 3-5 分钟), 4000 转/分离心 10 分钟, 取上清液待测 (上清液需要测定其蛋白浓度, 蛋白测定试剂盒本公司有售)。

2、**操作表:** (试剂一、二、三、四、五可按操作表加入比例及需要量预先混合好, 37℃ 预温 10 分钟后一次性加入反应, 但该混合液需现配现用, 不可保存)

	测定管	对照管*
试剂一 (mL)	1.0	1.0
试剂二 (mL)	0.05	0.05
试剂三 (mL)	0.05	0.05
试剂四 (mL)	0.025	0.025
试剂五 (mL)	0.05	0.05
混匀后, 37℃ 预温 10 分钟		
样本 (mL)	0.02	
蒸馏水 (mL)		0.02
加样本的同时开始计时, 快速混匀后, 波长 340nm, 0.5cm 光径的石英比色皿, 蒸馏水调零, 分光光度计测定 30 秒时吸光度 A ₁ 值, 然后将比色皿中的反应液倒入预先编号的原试管中, 放入 37℃ 水浴锅中准确水浴 15 分钟, 然后取出试管 (可提前 15 秒取出) 测定 15 分 30 秒时的吸光度 A ₂ 值, 计算 ΔA=A ₁ -A ₂ 。		

[注]: 因试剂太贵, 一般情况下对照管可以不做 (对照管

很稳定, 除非实验精确性要求很高), 所以只需做测定管 15 分钟前后的吸光度值之差。

五、计算:

(一)、血清(浆)的计算公式:

1、**单位定义:** 在 37℃, pH7.6 的条件下, 每升血清 (浆) 每分钟将 1μmol 的 PEP 转变成丙酮酸为一个酶活力单位 U。

2、计算公式:

$$\text{丙酮酸激酶活力 (U/L)} = \frac{\Delta A}{6.22 \times T \times d} \times \frac{V_{\text{反应}}}{V_{\text{样}}} \times 1000$$

(二)、组织及细胞样本计算公式:

1、**单位定义:** 在 37℃, pH7.6 的条件下, 每克蛋白对应的样本每分钟将 1μmol 的 PEP 转变成丙酮酸为一个酶活力单位 U。

2、计算公式:

$$\text{丙酮酸激酶活力 (U/g 蛋白)} = \frac{\Delta A}{6.22 \times T \times d} \times \frac{V_{\text{反应}}}{V_{\text{样}}} \div \text{Cpr}$$

以上公式中:

6.22: PEP 毫摩尔消光系数;

T: 反应时间, 15 分钟;

d: 比色光径, 0.5cm;

V_{反应}: 反应液总体积, 1.195mL;

V_样: 取样量, 0.02mL;

1000: 血清 (浆) 样本 mmol → μmol 转化。

Cpr: 组织匀浆蛋白浓度, g/mL。