

## 丙酮酸激酶 (Pyruvate kinase, PK) 试剂盒说明书

### 分光光度法 50 管/48 样

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  $\text{NAD}^+$ , 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 25  $\mu\text{L}$ ×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 50  $\mu\text{L}$  样本、50  $\mu\text{L}$  试剂三和 900  $\mu\text{L}$  试剂二, 混匀, 立即记录 340nm 处 20s 时的吸光值  $A_1$  和 2min20s 后的吸光值  $A_2$ , 计算  $\Delta A = A_1 - A_2$ 。

#### 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。

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

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。

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

(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。

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

(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。

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

$V_{\text{反总}}$ : 反应体系总体积,  $9.75 \times 10^{-4}$  L;  $\epsilon$ : NADH 摩尔消光系数,  $6.22 \times 10^3$  L / mol / cm;  $d$ : 比色皿光径, 1cm;  $V_{\text{样}}$ : 加入样本体积, 0.03 mL;  $V_{\text{样总}}$ : 加入提取液体积, 1 mL;  $T$ : 反应时间, 2min;  $C_{\text{pr}}$ : 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。