

## 丙酮酸激酶（PK）活性检测试剂盒说明书

微量法

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：BC0545

规格：100T/96S、200T/192S

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  | 100T 规格       | 200T 规格       | 保存条件   |
|-------|---------------|---------------|--------|
| 提取液   | 液体 110 mL×1 瓶 | 液体 110 mL×2 瓶 | 2-8℃保存 |
| 试剂一   | 液体 20 mL×1 瓶  | 液体 35 mL×1 瓶  | 2-8℃保存 |
| 试剂二 A | 粉剂×1 支        | 粉剂×1 瓶        | -20℃保存 |
| 试剂二 B | 粉剂×2 支        | 粉剂×2 支        | -20℃保存 |
| 试剂二 C | 粉剂×1 支        | 粉剂×1 瓶        | -20℃保存 |
| 试剂三   | 液体 20 μL×1 支  | 液体 35 μL×1 支  | 2-8℃保存 |

### 100T 溶液的配制：

- 1、试剂二 A：临用前加入 1.2mL 蒸馏水，用不完的试剂可-20℃分装保存 4 周，避免反复冻融；
- 2、试剂二 B：临用前取 1 支加入 0.645mL 蒸馏水，用不完的试剂可-20℃分装保存 4 周，避免反复冻融；
- 3、试剂二 C：临用前加入 1.2mL 蒸馏水，用不完的试剂可-20℃分装保存 4 周，避免反复冻融；
- 4、工作液的配制：根据样本按试剂一：试剂二 A：试剂二 B：试剂二 C=750μL：50μL：50μL：50μL（5T）的比例配制，现用现配；
- 5、试剂三：临用前根据用量按照试剂三：蒸馏水=5μL：295μL（30T）的比例充分混匀，冰上放置备用，现用现配。

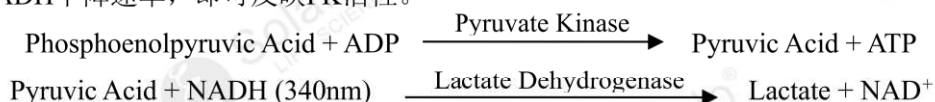
### 200T 溶液的配制：

- 1、试剂二 A：临用前加入 2.4mL 蒸馏水，用不完的试剂可-20℃分装保存 4 周，避免反复冻融；
- 2、试剂二 B：临用前取 1 支加入 1.29mL 蒸馏水，用不完的试剂可-20℃分装保存 4 周，避免反复冻融；
- 3、试剂二 C：临用前加入 2.4mL 蒸馏水，用不完的试剂可-20℃分装保存 4 周，避免反复冻融；
- 4、工作液的配制：根据样本按试剂一：试剂二 A：试剂二 B：试剂二 C=750μL：50μL：50μL：50μL（5T）的比例配制，现用现配；
- 5、试剂三：临用前根据用量按照试剂三：蒸馏水=5μL：295μL（30T）的比例充分混匀，冰上放置备用，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<sup>+</sup>，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。

### 需自备的仪器和用品：

紫外分光光度计/酶标仪、台式离心机、水浴锅/恒温培养箱、可调式移液器、微量石英比色皿/96孔UV板、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℃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）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、紫外分光光度计/酶标仪预热30min以上，调节波长至340nm，分光光度计蒸馏水调零。
- 2、工作液临用前于37℃预热10min。
- 3、加样表：

| 试剂名称（ $\mu\text{L}$ ） | 测定管 |
|-----------------------|-----|
| 样本                    | 10  |
| 试剂三                   | 10  |
| 工作液                   | 180 |

将上述试剂按顺序加入微量石英比色皿或96孔UV板中，立即充分混匀后于340nm处测定20s时的吸光值A1，迅速置于37℃准确反应2min（酶标仪有控温功能可将温度调至37℃），拿出迅速擦干测定2min20s时的吸光值A2。计算 $\Delta A = A1 - A2$ 。

#### 三、PK 活性计算

##### A. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下：

##### 1、按液体体积计算

单位的定义：每毫升液体每分钟消耗1nmol NADH定义为一个酶活力单位。

$$\text{PK活性 (U/mL)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 1608 \times \Delta A$$

##### 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。

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

##### 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。

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

##### 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。

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



V反总：反应体系总体积， $2 \times 10^{-4}$ L； $\epsilon$ ：NADH摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3$ L/mol/cm；d：微量石英比色皿光径，1 cm；V样：加入样本体积，0.01mL；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；500：细菌或细胞总数，500万。

#### B. 用96孔UV板测定的计算公式如下：

##### 1、按液体体积的计算

单位的定义：每毫升液体每分钟消耗1nmol NADH定义为一个酶活力单位。

$$\text{PK活性 (U/mL)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 2680 \times \Delta A$$

##### 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。

$$\text{PK活性 (U/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T = 2680 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

##### 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。

$$\text{PK活性 (U/g 质量)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 2680 \times \Delta A \div W$$

##### 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。

$$\text{PK活性 (U/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (N \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 2680 \times \Delta A \div N$$

V反总：反应体系总体积， $2 \times 10^{-4}$ L； $\epsilon$ ：NADH摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3$ L/mol/cm；d：96孔UV板光径，0.6cm；V样：加入样本体积，0.01mL；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. 测定过程中试剂三、样本在冰上放置，以免变性和失活。
2. 微量石英比色皿中反应液的温度尽量保持37℃，取小烧杯一只装入一定量的37℃蒸馏水，将此烧杯放入37℃水浴锅中。在反应过程中把微量石英比色皿连同反应液放在此烧杯中。或酶标板放入37℃恒温培养箱中孵育。
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 鼠肝，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。按照测定步骤操作，用微量石英比色皿测得计算 $A_1=0.726$ ， $A_2=0.243$ ， $\Delta A=A_1-A_2=0.483$ ，计算丙酮酸激酶活性得：  
 $\text{PK活性 (U/g 质量)} = 2680 \times \Delta A \div W = 12944.4 \text{ U/g 质量}$

#### 相关发表文献：

- [1] Yu Y, Tian D, Yu Y, Lu L, Shi W, Liu G. Microplastics aggravate the bioaccumulation and corresponding food safety risk of antibiotics in edible bivalves by constraining detoxification-related processes. *Sci Total Environ.* 2024 Jan 15;908:168436. doi: 10.1016/j.scitotenv.2023.168436. Epub 2023 Nov 8. PMID: 37949129.
- [2] Huang C, Zhang D, Wang Z, Zhao Y, Blecker C, Li S, Zheng X, Chen L. Validation of protein biological markers of lamb meat quality characteristics based on the different muscle types. *Food Chem.* 2023 Nov 30;427:136739. doi: 10.1016/j.foodchem.2023.136739. Epub 2023 Jun 26. PMID: 37392625.





[3] Bai Y, Ren C, Hou C, Chen L, Wang Z, Li X, Zhang D. Phosphorylation and acetylation responses of glycolytic enzymes in meat to different chilling rates. Food Chem. 2023 Sep 30;421:135896. doi: 10.1016/j.foodchem.2023.135896. Epub 2023 Mar 8. PMID: 37098310.

[4] Kou TS, Wu JH, Chen XW, Peng B. Functional proteomics identify mannitol metabolism in serum resistance and therapeutic implications in *Vibrio alginolyticus*. Front Immunol. 2022 Oct 31;13:1010526. doi: 10.3389/fimmu.2022.1010526. PMID: 36389821; PMCID: PMC9660324.

[5] Zhang Z, Luo W, Chen G, Chen J, Lin S, Ren T, Lin Z, Zhao C, Wen H, Nie Q, Meng X, Zhang X. Chicken muscle antibody array reveals the regulations of LDHA on myoblast differentiation through energy metabolism. Int J Biol Macromol. 2024 Jan;254(Pt 1):127629. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2023.127629. Epub 2023 Oct 25. PMID: 37890747.

#### 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

