

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

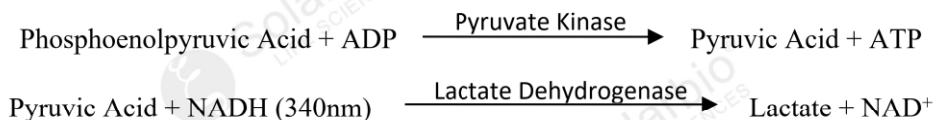
溶液的配制：

- 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℃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℃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℃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。

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℃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）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℃预热 10min。
3. 加样表：

试剂名称（ μ L）	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 A1，比色后迅速将 1 mL 石英比色皿连同反应液一起放入 37℃水浴中准确反应 2 分钟，迅速取出 1 mL 石英比色皿并擦干，340 nm 下比色，记录 2 分 20 秒时的吸光度 A2，计算 $\Delta A = A1 - A2$ 。

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， 9.75×10^{-4} L； ϵ ：NADH 摩尔消光系数， 6.22×10^3 L/mol/cm；d：1 mL 石英比色皿光径，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、1 mL 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 1 mL 石英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℃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30μL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℃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] Xu N, Yao Z, Shang G, Ye D, Wang H, Zhang H, Qu Y, Xu F, Wang Y, Qin Z, Zhu J, Zhang F, Feng J, Tian S, Liu Y, Zhao J, Hou J, Guo J, Hou Y, Ding C. Integrated proteogenomic characterization of urothelial carcinoma of the bladder. *J Hematol Oncol.* 2022 Jun 3;15(1):76. doi: 10.1186/s13045-022-01291-7. PMID: 35659036; PMCID: PMC9164575.
- [2] Du B, Ding D, Ma C, Guo W, Kang L. Locust density shapes energy metabolism and oxidative stress resulting in divergence of flight traits. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2022 Jan 4;119(1):e2115753118. doi: 10.1073/pnas.2115753118. PMID: 34969848; PMCID: PMC8740713.
- [3] Hou DY, Xiao WY, Wang JQ, Yaseen M, Wang ZJ, Fei Y, Wang MD, Wang L, Wang H, Shi X, Cai MM, Feng HT, Xu W, Li LL. OGA activated glycopeptide-based nano-activator to activate PKM2 tetramerization for switching catabolic pathways and sensitizing chemotherapy resistance. *Biomaterials.* 2022 May;284:121523. doi: 10.1016/j.biomaterials.2022.121523. Epub 2022 Apr 12. PMID: 35462306.
- [4] Ma WY, Wu QL, Wang SS, Wang HY, Ye JR, Sun HS, Feng ZP, He WB, Chu SF, Zhang Z, Chen NH. A breakdown of metabolic reprogramming in microglia induced by CKLF1 exacerbates immune tolerance in ischemic stroke. *J Neuroinflammation.* 2023 Apr 25;20(1):97. doi: 10.1186/s12974-023-02779-w. PMID: 37098609; PMCID: PMC10127063.
- [5] Shao C, Liu Y, Chen Z, Qin Y, Wang X, Wang X, Yan C, Zhu HL, Zhao J, Qian Y. 3D two-photon brain imaging reveals dihydroartemisinin exerts antiepileptic effects by modulating iron homeostasis. *Cell Chem Biol.* 2022 Jan 20;29(1):43-56.e12. doi: 10.1016/j.chembiol.2021.12.006. Epub 2021 Dec 21. PMID: 34936859.

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

