丙酮酸激酶(PK)试剂盒

微板法

本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断

使用说明书

货号：JL-T0767　　**有 效 期：**6 个月

规格：48T(48S)/96T(96S)　　**保存温度：**2-8℃和-20℃

实验原理：

丙酮酸激酶（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。丙酮酸激酶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。本试剂盒检测组织和细胞样本时，如需测定总蛋白浓度，推荐使用 BCA 法（货号：JL-T0336）。

注意事项：

1. 不能使用过期产品，不同货号和批号组分不得混用。
2. 本试剂开封后请尽快使用，以免空气、采样污染引起试剂变质。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 如果可能传播疾病，所有的样品都应管理好，按照规定的程序处理样品和检测装置。
5. 试剂严格按保存条件保存，不同测试盒中的试剂不能混用。对于体积较少的试剂，使用前请先离心，以免量取不到足够量的试剂。试剂盒中如有提供粉剂，使用前请甩几下，使粉剂落入底部。

产品组成：

试剂名称	规格（48T/48S）	规格（96T/96S）	保存条件
试剂一	10mL×1 瓶	20mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二 A	粉剂×1 瓶	粉剂×2 瓶	-20℃保存，避光
试剂二 B	粉剂×1 瓶	粉剂×2 瓶	-20℃保存，避光
试剂二 C	粉剂×1 瓶	粉剂×2 瓶	-20℃保存，避光
试剂三	粉剂×1 瓶	粉剂×2 瓶	-20℃保存，避光

所需仪器耗材及试剂：

离心机、酶标仪、可调式移液器、生理盐水。

样本处理及要求：

1. 建议实验前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定，根据预实验的结果，如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩，样本的稀释液为生理盐水。

2. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议做预实验验证其检测有效性。

3. **血清（浆）等液体样本**：直接测定。若浑浊，离心后取上清测定。

4. **组织样本：**按照组织质量(g)：生理盐水体积(mL)为 1:5~10 的比例（例如约 0.1g 组织，加入 1mL 生理盐水）进行冰浴匀浆，匀浆后，4℃，10000 g 离心 10min，取上清置冰上待测。如需检测蛋白浓度，可留取部分上清用于蛋白浓度测定。

5. **细菌/细胞样本：**收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；按照细菌/细胞数量（10^4）：生理盐水（mL）为 500~1000：1 的比例(建议按照每 500 万细菌或细胞加入 1mL 生理盐水),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)，10000 g，离心 10min，取上清置冰上待测。

检测前准备工作：

1. 请提前取出试剂盒，平衡至室温。

2. **试剂二 A：**临用前取一瓶加入 0.5mL 蒸馏水混匀，用不完的可-20℃分装保存 1 周，避免反复冻融。

3. **试剂二 B：**临用前取一瓶加入 0.5mL 蒸馏水混匀，用不完的可-20℃分装保存 1 周，避免反复冻融。

4. **试剂二 C：**临用前取一瓶加入 0.5mL 蒸馏水混匀，用不完的可-20℃分装保存 1 周，避免反复冻融。

5. **试剂三：**临用前取一瓶加入 1mL 蒸馏水混匀，冰上放置备用，现用现配，当天使用完毕。

6. **工作液的配置：**根据样本按试剂一：试剂二 A：试剂二 B：试剂二 C=270 μL：10μL：10μL：10μL 的比例充分混匀，现用现配。

操作步骤：

1. **酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 340nm。**

2. **样本测定（在石英 96 孔板中依次加入）：**

试剂名称（μL）	**测定孔**
样本	10
试剂三	10
工作液	180
混匀并震板 3s 后立即于 340nm 处检测各孔 OD 值，记为 A_1	
迅速置于 37℃准确反应 2min，于 340nm 处检测各孔 OD 值，记为 A_2，$\Delta A=A_1-A_2$	

注：1.测定过程中试剂三、样本在冰上放置，以免变性和失活。

实验结果结算：

1. **按液体体积计算：**

单位的定义：每 mL 液体每分钟消耗 1nmolNADH 定义为一个酶活力单位。

PK 活性(U/mL)=[$\triangle A \times V_{反总} \div (\varepsilon \times d) \times 10^9$]$\div V_{样} \div T \times N = 2572.4 \times \triangle A \times N$

2. **按蛋白浓度计算：**

单位的定义：每 mg 组织蛋白每分钟消耗 1nmolNADH 定义为一个酶活力单位。

PK 活性(U/mg prot)=[$\triangle A \times V_{反总} \div (\varepsilon \times d) \times 10^9$]$\div (Cpr \times V_{样}) \div T \times N = 2572.4 \times \triangle A \div Cpr \times N$

3. **按样本质量计算：**

单位的定义：每 g 组织每分钟消耗 1nmolNADH 定义为一个酶活力单位。

PK 活性(U/g 质量) =[$\triangle A \times V_{反总} \div (\varepsilon \times d) \times 10^9$]$\div (W \times V_{样} \div V_{提}) \div T \times N = 2572.4 \times \triangle A \div W \times N$

4. **按细菌或细胞密度计算：**

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 1nmolNADH 定义为一个酶活力单位。

PK 活性(U/10^4 cell)=[$\triangle A \times V_{反总} \div (\varepsilon \times d) \times 10^9$]$\div$(细胞数量$\times V_{样} \div V_{提}$)$\div T \times N = 2572.4 \times \triangle A \div$细胞数量$\times N$

注：

$V_{反总}$：反应体系总体积，2×10^{-4} L　$V_{样}$：加入样本体积，0.01mL

ε：NADH 摩尔消光系数，6.22×10^3 L/mol/cm

d：比色光径=体积÷底面积，标准 96 孔平底板底面积 0.32cm²中加入 0.2mL 液体时光径为 0.625cm

T：反应时间，2min

N：样本稀释倍数

$V_{提}$：加入提取液体积，1mL

Cpr：待测样本的蛋白浓度，mg/mL

W：样本鲜重，g

参考样本数据：

以下数据仅供参考：

样本类型	稀释倍数	参考值
绿萝（10%匀浆）	2 倍稀释	636.457U/g
大鼠肝脏（10%匀浆）	不稀释	11069.034U/g
小鼠肾脏（10%匀浆）	不稀释	10613.547U/g

Note:

Note:

咨询电话：400-0066-400

传　　真：021-55660885

电子邮箱：shjlsw@163.com

网　　址：www.jonln.com