

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

产品货号: E-BC-K611-M

产品规格: 48T(48 samples)/96T(96 samples)

检测仪器: 酶标仪(330-350 nm)

Elabscience®丙酮酸激酶(PK)比色法测试盒

Pyruvate Kinase (PK) Activity Assay Kit

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话: 400-999-2100

邮箱: biochemical@elabscience.cn

网址: www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。

联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

用途

本试剂盒适用于检测血清(浆)、动物组织和细胞等样本中丙酮酸激酶(PK)的活力。

检测原理

丙酮酸激酶 (pyruvate kinase, PK), 别名丙酮酸磷转移酶、磷酸丙酮酸激酶, 是糖酵解途径中的一个关键酶, 能催化磷酸烯醇式丙酮酸转化为烯醇式丙酮酸, 并产生 ATP, 所以具有重要的生理作用。

在二磷酸腺苷 (ADP) 存在的条件下, 丙酮酸激酶 (PK) 催化磷酸烯醇丙酮酸 (PEP) 转化成丙酮酸, 丙酮酸被 LDH 转化为乳酸, 同时 NADH 转化为 NAD⁺, 检测 340 nm 下吸光值变化来计算得到丙酮酸激酶的活力。

本试剂盒检测组织或细胞样本时, 需测定总蛋白浓度, 推荐使用本公司 BCA 试剂盒(货号 E-BC-K318-M)进行测定。

提供试剂和物品

编号	名称	规格 1 (Size 1)(48 T)	规格 2 (Size 2)(96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	缓冲液 (Buffer Solution)	10 mL×1 瓶	10 mL×2 瓶	-20℃ 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	底物 A (Substrate A)	粉剂×1 支	粉剂×2 支	-20℃ 避光 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	底物 B (Substrate B)	粉剂×1 支	粉剂×2 支	-20℃ 避光 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	酶溶液 (Enzyme Solution)	1.2 mL×1 支	1.2 mL×2 支	-20℃ 避光 保存 6 个月
	96 孔 UV 酶标板	1 板		
	96 孔覆膜	2 张		
	样本位置标记表	1 张		

说明: 试剂严格按上表中的保存条件保存, 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。

所需自备物品

仪器：酶标仪(330-350 nm，最佳检测波长 340 nm)，恒温箱(37 ℃)、匀浆机、低温离心机

试剂：生理盐水 (0.9% NaCl)

试剂准备

① 检测前，试剂平衡至室温。

② 试剂二工作液配制：

取一支试剂二，用 1.2 mL 双蒸水溶解混匀，置于冰盒上避光待用，未用完部分-20 ℃ 避光保存 3 天。

③ 试剂三工作液配制：

取一支试剂三，然后用 10 mL 试剂一溶解，未用完部分-20 ℃ 避光保存 3 天。

④ 酶工作液配制：

将试剂二工作液与试剂四按照体积比 1: 1 混合，配制好的工作液置于冰盒上避光保存，按需配制，当天使用完毕。

样本准备

① 样本处理

组织样本：组织处理的匀浆介质为生理盐水（0.9% NaCl），匀浆后离心取上清，留取部分上清用于蛋白浓度测定。

细胞样本：取 1×10^6 个细胞加入200 μ L生理盐水（0.9% NaCl）进行匀浆，离心取上清，留取部分上清用于蛋白浓度测定。

血清(浆)样本：直接测定(若样本浑浊，可12000 \times g离心10 min后使用)。

② 样本的稀释

在正式检测前，需选择 2-3 个预期差异大的样本稀释成不同浓度进行预实验，根据预实验的结果，结合本试剂盒的线性范围：0.08-6.79 U/L，请参看下表稀释(仅供参考)：

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
10%大鼠肾组织	4-6	10%大鼠肺组织	4-6
10%大鼠肝组织	4-6	10%大鼠脑组织	4-6
10%小鼠肝组织	4-6	10%小鼠心组织	4-6
大鼠血清	不稀释	大鼠血浆	不稀释
小鼠血清	不稀释	小鼠血浆	不稀释
人血清	不稀释	狗血浆	不稀释
HL-60 细胞	不稀释	293T 细胞	不稀释

注：稀释液为生理盐水（0.9% NaCl）。

实验关键点

- ① 尽量选取新鲜样本进行测定，长期存放的样本 PK 酶活有损失。
- ② 血清类样本如测定值较低，可延长 A₂ 测定时间。

操作步骤

- ① 取 10 μL 待测样本加入到各酶标孔中。
- ② 向步骤①中各孔依次加入 150 μL 试剂三工作液和 40 μL 酶工作液。
- ③ 酶标仪 340 nm 处测定 20 s 时的 OD 值 A_1 和 3 min 20 s 时的吸光值 A_2 ，计算 $\Delta A = A_1 - A_2$ 。

操作表

	测定孔
待测样本(μL)	10
试剂三工作液(μL)	150
酶工作液(μL)	40
酶标仪 340 nm 处测定 20 s 时的吸光值 A_1 和 3 min 20 s 时的吸光值 A_2 ， 计算 $\Delta A = A_1 - A_2$ 。	

本试剂盒检测组织或细胞样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用本公司 BCA 试剂盒(货号 E-BC-K318-M)进行测定。

结果计算

① 组织和细胞样本中丙酮酸激酶 (PK) 活力计算公式:

定义: 室温下, 每克组织或细胞蛋白每分钟还原 1 mmol NADH 消耗的酶量为一个活力单位。

$$\text{PK 活性 (U/gprot)} = \left(\frac{\Delta A_{340}}{6220 \times d} \times V_{\text{总}} \right) \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \times f \times 1000$$

② 血清(浆)样本中丙酮酸激酶 (PK) 活力计算公式:

定义: 室温下, 每升血清(浆)每分钟还原 1 mmol NADH 消耗的酶量为一个活力单位。

$$\text{PK 活性 (U/L)} = \left(\frac{\Delta A_{340}}{6220 \times d} \times V_{\text{总}} \right) \div V_{\text{样}} \div T \times f \times 1000$$

注解:

ΔA_{340} : $A_1 - A_2$

6220: NADH 摩尔吸光系数, L/mol cm

d: 96 孔板光径, 0.6 cm

$V_{\text{总}}$: 反应体系总体积, 0.2 mL

$V_{\text{样}}$: 加入的样本体积, 0.01 mL

C_{pr} : 样本蛋白浓度, gprot/L

T: 样本反应时间, 3 min

f: 样本加入检测体系前的稀释倍数

1000: 1 mol/L = 1000 mmol/L

附录 1 关键数据

1. 技术参数

检测范围	0.08-6.79 U/L	平均批间差	7.0 %
灵敏度	0.08 U/L	平均批内差	5.0 %
平均回收率	103 %		

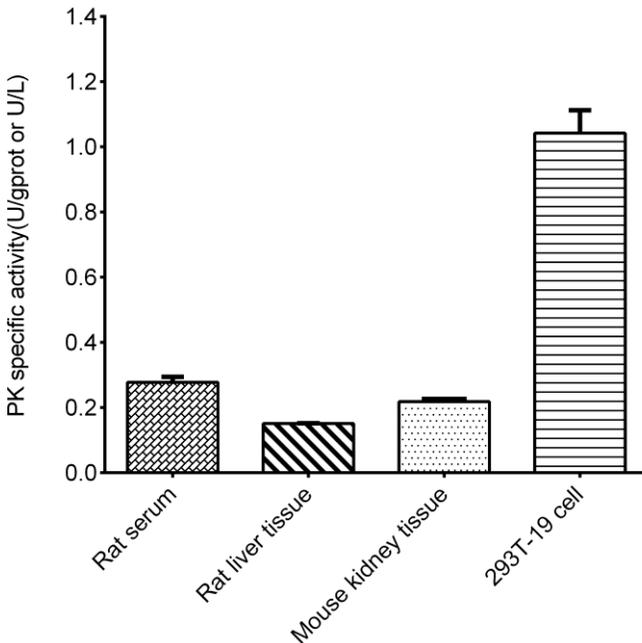
附录 2 实例分析

例如检测大鼠肝组织(数据仅供参考):

取稀释 5 倍的 10% 大鼠肝组织匀浆上清液 10 μL , 按操作表操作, 结果如下: 测定初始 OD 值 A_1 为 1.043, 反应 3 min 后测定 OD 值 A_2 为 0.892, 10% 大鼠肝组织匀浆蛋白浓度为 8.95 gprot/L 计算结果为:

$$\text{PK 活力} = (1.043 - 0.892) \div (6220 \times 0.6) \times 0.2 \div (0.01 \times 8.95) \div 3 \times 5 \times 1000 = 0.15 \text{ U/gprot (U/gprot)}$$

按照说明书操作, 测定大鼠血清(加样量 10 μL)、大鼠肝组织(10%蛋白浓度为 8.95 gprot/L, 稀释 5 倍, 加样量 10 μL)、小鼠肾组织(10%蛋白浓度为 9.52 gprot/L, 稀释 5 倍, 加样量 10 μL)和 293T 细胞(蛋白浓度为 1.80 gprot/L, 加样量 10 μL)中 PK 活力(如下图):



附录3 问题答疑

问题	可能原因	建议解决方案
初始 OD 值较小	酶工作液配制时间过久	保证酶工作液在三天内使用完毕
	样本的酶活较高,使得底物瞬间被消耗	增大样本的稀释倍数
变化 OD 值较小	样本稀释倍数较大	减小样本稀释倍数
	选取的样本不新鲜	尽量选择新鲜的样本测定

声明

1. 试剂盒仅供研究使用,如将其用于临床诊断或任何其他用途,我公司将不对因此产生的问题负责,亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器,严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等于样本中待测物的浓度范围。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。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中,建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责,不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责,使用前请充分考虑样本可能的使用量,预留充足的样本。

