

CheKine™ 丙酮酸激酶 (PK) 活性检测试剂盒 (微量法)

货号: KTB1120

规格: 48 T/48 S 96 T/96 S

批号: 见产品标签

	适用样本: 动植物组织、细胞、细菌、血清 (浆)
	保质期: -20℃, 避光保存 12 个月

01 背景与原理

丙酮酸激酶 (Pyruvate Kinase, PK, EC 2.7.1.40) 广泛存在于动物、植物、微生物和培养的细胞中, 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。

本试剂盒检测原理是 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⁺, 测定 NADH 在 340 nm 处吸光度值的变化即可计算样本中 PK 的活性。

02 包装清单

试剂盒组分	规格		储存要求
	48 T	96 T	
Extraction Buffer	60 mL	60 mL×2	4℃
Assay Buffer	12 mL	24 mL	4℃
Substrate Mix	Powder×1 vial	Powder×1 vial	-20℃, 避光保存
LDH	10.2 μL	20.4 μL	4℃

*请在实验前检查各组分的量。

*各组分在规格基础上额外提供 10% 的量用于进行标准曲线制作或预实验。

03 自备仪器与试剂

自备资源类型	资源名称	备注
仪器	酶标仪	能测 340 nm 处的吸光度
耗材	96 孔 UV 板	紫外透明板
试剂	PBS (pH 7.4) /去离子水	清洗细胞（菌）用/试剂配制用
其他	匀浆器（组织样本）、恒温箱、冰盒、低温离心机、 可调节式移液枪及枪头	检测量较大时合理使用多通道移液器有 助于提高实验效率

04 注意事项

- 正式检测前，建议选择 **2-3** 个预期差异较大的样本进行预实验。
- 对于组织样本及细胞样本等，可通过测定蛋白浓度来进行样本间结果均一化。推荐使用亚科因货号：KTD3001 的蛋白质定量试剂盒（BCA 法）。
- 本试剂盒兼容分光光度计检测，请按照分光光度计检测要求按比例调节检测试剂配制量。如有疑问，可咨询本司技术人员（400-6800-830）。
- 生化检测试剂普遍具有刺激性、生物毒性等，为了您的安全和健康，请在实验全程做好生物安全防护，穿戴实验服、口罩、手套、头套等安全护具，在通风橱、生物安全柜中进行实验。
- 本产品仅供科学研究使用，不适用于临床诊断。

05 实验流程

05-1 试剂准备

试剂名称	试剂准备	注意事项
Extraction Buffer	即用型；使用前平衡到室温	4℃保存
Assay Buffer	即用型；使用前平衡到室温	4℃保存
Substrate Mix Working Reagent	临用前配制； 48 T 加入 10.2 mL Assay Buffer 和 0.6 mL 去离子水； 96 T 加入 20.4 mL Assay Buffer 和 1.2 mL 去离子水；充分溶解	分装后-20℃保存 6 个月，避免反复冻融。使用前置于 25℃（一般物种）或者 37℃（哺乳动物）孵育 5 min。
LDH Working Reagent	临用前配制； 48 T 加入 0.6 mL 去离子水； 96 T 加入 1.2 mL 去离子水；充分混匀	置冰上待用；稀释后 4℃保存 1 个月

05-2 样本制备

注意：推荐使用新鲜样本，如果不立即进行实验，样本可在-80℃保存 1 个月。该试剂盒提取的样本也可以适用于 KTB1251、KTB1341 试剂盒。

- 动植物组织样本：称取约 0.1 g 样本，加入 1 mL Extraction Buffer，冰浴匀浆，8000 g，4℃离心 10 min，取上清液置冰上待测。
- 细胞（菌）：收集 5×10⁶ 个细胞或细菌到离心管内，用冷 PBS 清洗细胞或细菌，离心后弃上清，加入 1 mL Extraction Buffer，冰浴超声破碎 5 min（功率 20%或 200 W，超声 3 s，间隔 7 s，重复 30 次），然后 8000 g，4℃离心 10 min，取上清液置冰上待测。

- 血清（浆）和其他液体样本：直接检测。

05-3 实验步骤

1. 酶标仪准备：预热 30 min 以上，调节波长到 340 nm。
2. 检测体系配制：在 96 孔 UV 板中依次加入 10 μ L 样本，10 μ L LDH Working Reagent 和 180 μ L Substrate Mix Working Reagent，迅速混匀。
3. 吸光度检测：混匀后立即测定 340 nm 处第 20 s 时的吸光度值和第 2 min 20 s 时的吸光度值，分别记为 A_1 和 A_2 。

06 结果计算

06-1 自动计算

为帮助您更轻松、准确地完成相关计算，我们特在官网提供了“在线计算器小工具”。您无需手动计算，只需在网页上输入数值，即可快速获得可靠结果。访问方式：请扫描右侧二维码或访问官网[\[https://www.abbkine.cn\]](https://www.abbkine.cn)进入“技术中心”查找“在线计算器”工具。



06-2 手动计算

以下为您提供的推导过程计算公式和简洁计算公式，两者完全相等。

1. 数据处理

计算 $\Delta A = A_1 - A_2$ 。

2. 样本 PK 活性计算

● 按样本质量计算

酶活单位的定义：每 g 组织在反应体系中每分钟消耗 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$PK (U/g) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T = 3215 \times \Delta A \div W$$

● 按细胞（菌）数量计算

酶活单位的定义：每 10^4 个细菌或细胞在反应体系中每分钟消耗 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$PK (U/10^4) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times 500) \div T = 3215 \times \Delta A \div 500 = 6.431 \times \Delta A$$

● 按液体体积计算

酶活单位的定义：每 mL 血清（浆）在反应体系中每分钟消耗 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$PK (U/mL) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 3215 \times \Delta A$$

● 按蛋白浓度计算

酶活单位的定义：每 mg 蛋白在反应体系中每分钟消耗 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$PK (U/mg \text{ prot}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (Cpr \times V_{\text{样}}) \div T = 3215 \times \Delta A \div Cpr$$

$V_{\text{反总}}$ ：反应体系总体积， 2×10^{-4} L； ϵ ：NADH 摩尔消光系数， 6.22×10^3 L/mol/cm；d：96 孔板光径，0.5 cm； 10^9 ：1 mol = 1×10^9 nmol； $V_{\text{样}}$ ：加入样本体积，0.01 mL； $V_{\text{样总}}$ ：加入 Extraction Buffer 体积，1 mL；T：反应时间，2 min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；500：细胞或细菌数量， 5×10^6 ，以 10^4 为单位。

07 结果展示

示例-1: 取 10 μL 大鼠血清, 按照测定步骤操作, 用 96 孔 UV 板进行检测。测得 $\Delta A = A_1 - A_2 = 0.632 - 0.588 = 0.044$, 按液体体积计算得: $\text{PK (U/mL)} = 3215 \times \Delta A = 3215 \times 0.044 = 141.46 \text{ U/mL}$ 。

08 FAQ

- 检测得到的样本 ΔA 过高或者过低怎么办?

如果样本的 $\Delta A > 1.0$, 则说明样本 PK 活性较高, 需用 Extraction Buffer 适当稀释或减少提取用样本量, 再重新进行测定。如果样本的 $\Delta A < 0.005$, 可延长反应时间到 5 min 或 10 min 或者适当加大样本量, 再重新进行测定。

- 多个样本同时检测时会不会影响检测结果?

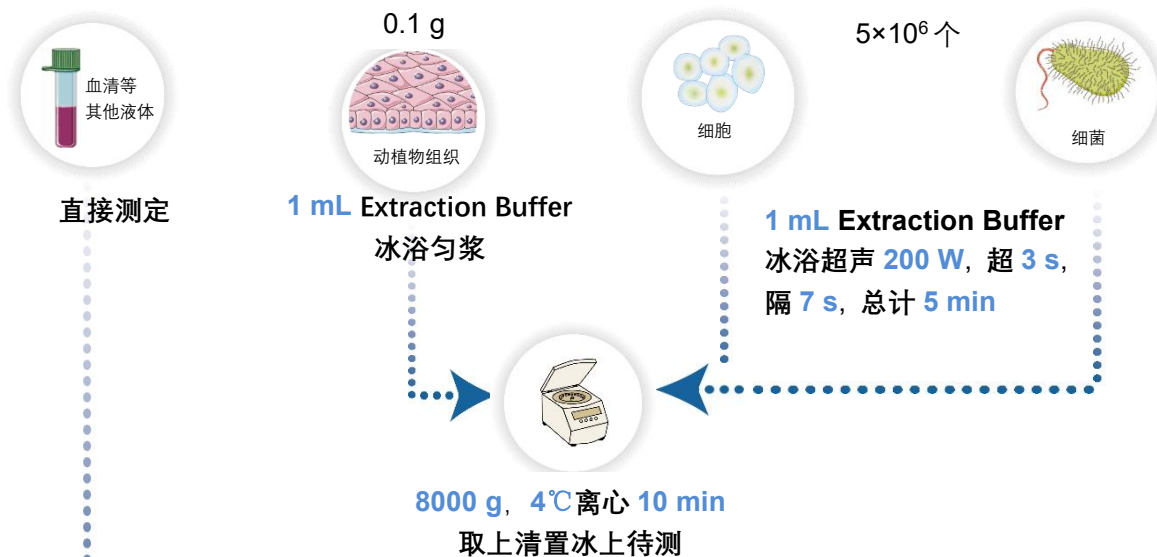
本项目适当延长时间 3-5 min 不会影响检测结果, 多样本检测时建议用排枪操作。

09 相关产品

货号	试剂盒名称
KTB1100	CheKine™ 乳酸含量检测试剂盒 (微量法)
KTB1110	CheKine™ 乳酸脱氢酶 (LDH) 活性检测试剂盒 (微量法)
KTB1111	CheKine™ D-乳酸脱氢酶 (D-LDH) 活性检测试剂盒 (微量法)
KTB1121	CheKine™ 丙酮酸 (PA) 含量检测试剂盒 (微量法)
KTB1300	CheKine™ 葡萄糖含量检测试剂盒 (微量法)
KTB1310	CheKine™ 葡萄糖氧化酶 (GOD) 活性检测试剂盒 (微量法)

CheKine™ 丙酮酸激酶(PK)活性检测流程图 (Abbkine 货号: KTB1120)

样本处理



体系配置



数据检测

迅速混匀, 测定 20 s 时的 340 nm 吸光度 A_1
反应 2 min

测定 2 min 20 s 时的 340 nm 吸光度 A_2
结果计算