

PK 检测方法 (Pyruvate Kinase) S10172

1 原理



NADH 的消耗可以通过 340nm 的光吸收进行检测。

2 试剂:

2.1: 0.1M 咪唑-HCl 缓冲液, pH 7.2: 称取 6.81 g 咪唑溶于 800ml 的水中,用盐酸调 pH 为 7.2, 定容至 1L, 保存温度 4 度

2.2 100mM ADP 溶液: 取 0.507 个 ADP 2H₂O, 溶于 9ml 水中中和 1ml1N NaOH, 保存温度 4 度

2.3 13.1mM NADH 溶液: 称取称取 10mg NADH 2Na 盐, 溶于 1 水中直至完全溶解, 保存温度 4 度

2.4 56mMPEP K 盐溶液: 称取 150mg PEP K, 溶于 10 水中直至完全溶解, 保存于 4 度

2.5 1M MgCl₂ 溶液: 称取 20.33g MgCl₂, 溶于 100ml 的蒸馏水中, 保存于 4 度

2.6 2.5M KCl 溶液: 称取 18.64g KCl, 溶于 100ml 的蒸馏水中, 保存于 4 度

2.7 6000U/ml LDH 溶液: 称取一定量 LDH 溶于, 溶于一定数量的蒸馏水中, 保存于 4 度

2.8 酶稀释液: 50mM Tris-HCl, pH 8.5

2.9 工作液

22.71ml	0.1M 咪唑-HCl 缓冲液	2.40 ml	100mM ADP 溶液
0.45ml	NADH 溶液	3.00ml	PEP K 盐溶液
0.48ml	MgCl ₂ 溶液	0.90ml	KCl 溶液
0.06ml	LDH 溶液		

3 操作规程:

3.1 仪器参数设定

若仪器中无已保存参数, 按以下参数设定。若已有相关参数, 调取后确认。

检测方法: 动力学扫描

测量波长: 340nm 测量时间: 300s

延迟时间: 120s 积分时间: 180s

系数/因子: 4.98 测量温度: 30±0.5℃

3.2 样品准备

若待测样品为固体, 可以按 10mg 样品/1000ul 超纯水比例溶解。溶解后于室温放置 30min。

3.3 检测方法

3.3.1 在石英比色皿中加入 0.6ml 工作液, 温浴 2min。

3.3.2 加入 20ul 样品, 温和混匀后开始测定。

3.3.3 测定结束后, 记录相应数值: 起始读数、 $\Delta A/\text{min test}$ 、活性值 (U/ml)。

3.3.4 活性值 (U/ml) 范围为 0.1-1.0U/ml, 若超出范围, 待测样品需经酶稀释液稀释后再次进行检测。

3.3.5 测定样品前需检测空白反应值, 即其他操作不变, 用 25ul G 代替样品加入比色皿后进行反应 测定 $\Delta A/\text{min blank}$ 。

3.3.6 计算公式 活性(U/ml) = $(\Delta A/\text{min test} - \Delta A/\text{min blank}) \times 4.98 \times \text{df}$ (稀释倍数)