

丙酮酸激酶 (PK) 测试盒说明书(精简版)

(货号: A076-2-1 测红细胞 50 管/48 样)

免责声明: 测试前请仔细阅读说明书, 预试后再进行批量实验, 否则由此导致的后果用户自行承担!

一、测定原理:

丙酮酸激酶 (pyruvate kinase, PK) 在 ADP 存在下可催化 PEP 产生丙酮酸, 丙酮酸再由 LDH 将其转变为乳酸, 同时将 NADH 变为 NAD。

将 1 μmol 的 PEP 转变成丙酮酸为一个酶活力单位。

二、试剂组成与配制: (试剂盒有效期 3 个月)

试剂一: 液体 60mL×1 瓶, 4℃ 保存。

试剂二: 粉剂×2 支, -20℃ 保存, 每支用时加双蒸水 1.4mL, 用不完-20℃ 以下保存 3~7 天。(如果你的样本量少, 可以将 1.4mL 再分成 2~3 管放-20℃ 以下保存, 每次取一管用, 以免反复冻融)

试剂三: 液体×4 支, 4℃ 保存, 不可冷冻, 用不完 4℃~8℃ 保存。

试剂四: 粉剂×4 支, -20℃ 保存, 用时每支加双蒸水 320 μL, 用不完-20℃ 以下保存。

试剂五: 粉剂×4 支, -20℃ 保存, 用时每支加双蒸水 650 μL, 用不完-20℃ 以下保存。

试剂六: 稳定剂 20mL×1 瓶, 4℃ 保存。

三、所需仪器及试剂:

可调 340nm 波长的紫外分光光度计及 0.5cm 光径石英比色皿, 涡旋混匀器, 37℃ 水浴锅, 秒表, 蒸馏水, 生理盐水, 血红蛋白测定试剂 (本公司有售)。

四、操作过程:

1、样本前处理:

①、50% 红细胞悬液的制备: 取肝素抗凝全血, 放冰箱 4℃~8℃ 自然沉淀, 吸弃血浆、白细胞、血小板部分, 用冷的生理盐水洗涤红细胞 1~3 次, 1000 转/分钟离心 5 分钟, 洗完后再用冷的生理盐水制成 50% 红细胞悬液(红细胞:生理盐水=1:1)。[注]: 当天若来不及检测, 最好以全血形式 4℃~8℃ 可保存 4~5 天。如果你的样本很多, 也可以直接吸取离心后沉淀的红细胞制备成 1:19 的溶血液。

②、1:19 溶血液的制备: 取 50% 的红细胞悬液 20 μL 加试剂六稳定剂 180 μL, 即 1:9 稀释后备用。

③、血红蛋白测定: 取 1:19 溶血液用氰化高铁血红蛋白测定试剂进行血红蛋白 Hb 的测定, 具体见 Hb 测定说明书。

2、操作表:

	测定管	对照管*
试剂一 (mL)	1.0	1.0
试剂二 (mL)	0.05	0.05
试剂三 (mL)	0.05	0.05
试剂四 (mL)	0.025	0.025
试剂五 (mL)	0.05	0.05
混匀后, 37℃ 预温 10 分钟		
双蒸水 (mL)		0.02
样本 (mL)	0.02	
加样本的同时开始计时, 快速混匀后, 波长 340nm, 0.5cm 光径的石英比色皿, 双蒸水调零, 测定 30 秒时初始吸光度 A ₁ 值, 然后将比色皿中的反应液倒入预先编号的原试管中, 放入 37℃ 水浴箱中准确水浴 15 分钟, 然后取出试管测定 15 分 30 秒时的吸光度 A ₂ 值。		

[注]: 因试剂太贵, 一般情况下对照管不需要做 (对照管很稳定, 除非实验精确性要求很高), 所以只需做测定管 15 分钟前后的吸光度 OD 值之差。

五、计算:

1、单位定义: 在 37℃, pH7.6 的条件下, 每克 Hb 每分钟

2、计算公式:

$$\text{丙酮酸激酶活力 (U/gHb)} = \frac{\Delta A}{6.22 \times T \times d} \times \frac{V_{\text{反应}}}{V_{\text{样}}} \div C_{\text{Hb}}$$

6.22: PEP 毫摩尔消光系数;

T: 反应时间, 15 分钟;

d: 比色光径, 0.5cm;

V_{反应}: 反应液总体积, 1.195mL;

V_样: 取样量, 0.02mL;

C_{Hb}: 溶血液血红蛋白浓度, gHb/mL。

六、测定意义:

丙酮酸激酶 (PK), 是红细胞葡萄糖无氧酵解途径中三个限速酶之一, 直接关系着红细胞能量代谢, 此酶缺乏属常染色体隐性遗传, 可能导致非球形红细胞溶血性贫血。