

Amplex Red丙酮酸激酶检测试剂盒

产品编号	产品名称	包装
S0303S	Amplex Red丙酮酸激酶检测试剂盒	100次

产品简介:

- 碧云天研发的Amplex Red丙酮酸激酶检测试剂盒(Amplex Red Pyruvate Kinase Assay Kit, 简称Amplex Red PK Assay Kit)是一种基于探针Amplex Red, 利用荧光或吸光度检测, 快速、高灵敏地对血清、血浆、尿液等生物体液、组织、细胞以及组织或细胞培养上清样品中丙酮酸激酶酶活力进行检测的试剂盒。通常0.2-2 μ l血清或血浆样品就足够用于本试剂盒的荧光法检测。
- 丙酮酸激酶(Pyruvate kinase, PK), 也称丙酮酸磷转移酶、磷酸烯醇式丙酮酸激酶, 是糖酵解途径中的一种磷酸基转移酶, 能够催化磷酸烯醇式丙酮酸和ADP转变成丙酮酸和ATP, 是糖酵解过程中的主要限速酶之一。丙酮酸激酶有M型和L型两种同工酶, M型同工酶又分为M1及M2亚型。M1亚型分布于心肌、骨骼肌和脑组织; M2亚型分布于脑及肝脏等组织。L型同工酶主要分布于肝脏、肾脏及红细胞内。丙酮酸激酶可在心肌细胞出现坏死时释放到血液中, 因此测定血液中的PK含量可用于辅助诊断心肌梗死。急性心肌梗死、宫颈癌、淋巴瘤、髓性白血病和霍奇金氏病病人血清总丙酮酸激酶活性也会明显增高。丙酮酸激酶的缺乏会限制糖酵解的速度并导致相关疾病, 例如, 肌原性疾病及先天性非球形红细胞溶血性贫血、急性白血病、再生障碍性贫血等血液系统疾病病人红细胞中总丙酮酸激酶活性显著降低[1,2]。
- 本试剂盒中的Amplex Red是一种对H₂O₂高度敏感的荧光探针。在辣根过氧化物酶(Horseradish peroxidase, HRP)存在的情况下, Amplex Red能与H₂O₂ 1:1反应, 产生强烈的红色荧光物质试卤灵(Resorufin)。试卤灵的最大激发波长为571nm, 最大发射波长为585nm, 并且在激发波长处有很强的可见光吸收。因此本试剂盒可以用吸光度和荧光两种方法来进行检测。
- 本试剂盒的检测原理请参考图1。丙酮酸激酶(Pyruvate kinase, PK)催化磷酸烯醇式丙酮酸(Phosphoenolpyruvate, PEP)和ADP反应产生丙酮酸(Pyruvic acid)和ATP, 在黄素腺嘌呤二核苷酸(Flavin adenine dinucleotide, FAD)、硫胺素焦磷酸(Thiamine pyrophosphate, TPP)和镁离子(Mg²⁺)的存在下, 生成的丙酮酸进一步在丙酮酸氧化酶(Pyruvate oxidase, PO)的作用下和氧气发生氧化反应生成乙酰磷酸(Acetyl phosphate)、CO₂和H₂O₂, 再通过检测H₂O₂与Amplex Red的反应产物试卤灵(Resorufin)的荧光强度或吸光度来最终计算样品中丙酮酸激酶的酶活力。试卤灵的荧光强度或吸光度与样品中丙酮酸激酶的酶活力成正比。

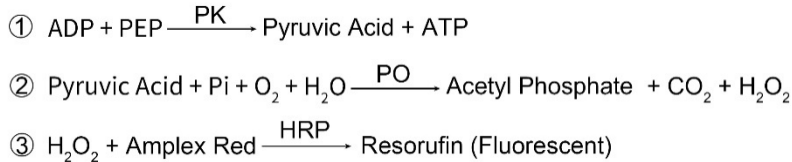


图1. 碧云天Amplex Red丙酮酸激酶检测试剂盒(S0303)检测原理图。

- 本试剂盒检测灵敏度高, 线性范围宽, 样品用量少。**本试剂盒在样品体积为20 μ l时, 采用吸光度检测可以检测浓度低至0.3U/L的丙酮酸激酶, 在0.3-16.7U/L活力范围内有良好的线性关系; 采用荧光检测可以检测浓度低至0.03U/L的丙酮酸激酶, 在0.03-6.7U/L活力范围内有良好的线性关系。荧光检测的灵敏度比吸光度检测高约10倍, 可以使用更少量的样品。本试剂盒提供了丙酮酸激酶的作用产物丙酮酸为标准溶液, 可以通过绘制标准曲线(图2), 间接计算出样品中的丙酮酸激酶的酶活力。

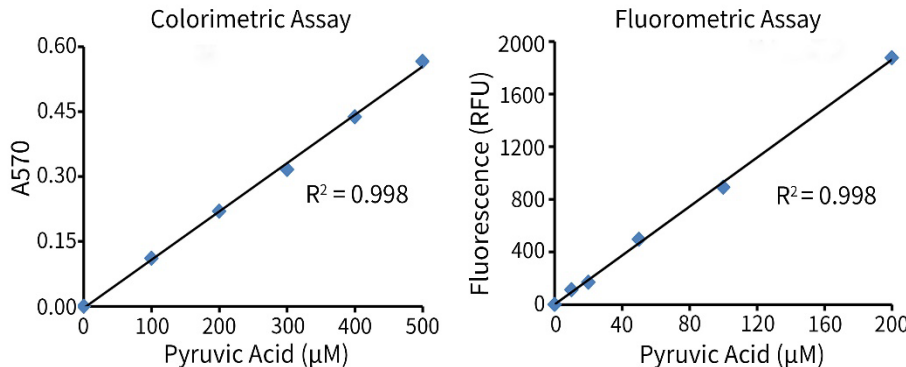


图2. 碧云天Amplex Red丙酮酸激酶检测试剂盒(S0303)检测丙酮酸标准品的标准曲线。左图为吸光度检测, 右图为荧光检测。本试剂盒采用吸光度检测时, 在10-500 μ M浓度范围内有良好的线性关系; 采用荧光检测时, 在1-200 μ M浓度范围内有良好的线性关系。实际检测数据会因实验条件、检测仪器等的不同而存在差异, 图中数据仅供参考。

- 本试剂盒检测方法灵活, 检测速度快。**本试剂盒既可以进行荧光检测, 也可进行吸光度检测。整个检测过程约1小时即可完成。

- **本试剂盒提供的检测裂解液有一定的通用性。**使用本试剂盒中的BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay裂解获得的细胞或组织样品，也可以用于碧云天生产的其它代谢类试剂盒中同样使用BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay进行裂解的样品检测，通用性强；而且还可用于检测蛋白浓度、进行SDS-PAGE或一些较易溶解蛋白的Western检测。
- **本试剂盒应用范围广。**本试剂盒可用于小鼠、大鼠、人等的血清、血浆、尿液等生物体液，细胞培养上清、组织或细胞样品等的检测。本试剂盒不仅适合少量样本的检测，也非常适合高通量筛选(High-throughput screening)的自动化操作系统。
- 按照使用说明操作，用于96孔板检测时，本试剂盒小包装可以进行100次检测。

包装清单：

产品编号	产品名称	包装
S0303S-1	BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay	20ml
S0303S-2	Pyruvate Kinase Assay Buffer	20ml
S0303S-3	Amplex Red	200μl
S0303S-4	Enzyme Mix	200μl
S0303S-5	Cofactor	200μl
S0303S-6	Substrate	200μl
S0303S-7	Pyruvate Standard (10mM)	200μl
—	说明书	1份

保存条件：

-20°C保存，一年有效。其中Amplex Red和Cofactor须避光保存。

注意事项：

- Amplex Red在空气中不太稳定，开启后应尽快使用，且在使用过程中需注意适当避光。
- Amplex Red的反应产物在还原剂的存在下会很不稳定，因此最终反应体系中的二硫苏糖醇(DTT)、β-巯基乙醇或类似还原剂的浓度应低于10μM。
- 请确保反应体系的pH值在7-8之间，否则会影响Amplex Red的稳定性和荧光值。
- Amplex Red和Pyruvate Kinase Assay Buffer需要完全解冻并平衡至室温后再使用，否则会影响检测结果。其它各种溶液使用时应在冰上进行。
- 为减少稀释液产生的荧光背景带来的误差，样品和标准品的稀释液应该根据样品的种类来定。当样品为BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay制备的细胞或组织的裂解样品时，应使用BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay稀释，当样品为血液等其它样品时，宜使用Pyruvate Kinase Assay Buffer稀释。
- 血清、血浆等样品如果在4°C保存，保存的时间不得超过2周，否则会影响检测结果的准确性。通常血清样品宜在-20°C保存，-80°C保存更佳。
- 荧光酶标仪检测时需使用适合荧光检测的黑板或白板，推荐使用碧云天BeyoGold™全黑96孔细胞培养板(平底带盖，独立包装)(FCP966)或BeyoGold™黑色透明底96孔细胞培养板(平底带盖，独立包装)(FCP965)。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明：

1. 样品的准备：

- 血液样品的准备：对于血清样品，将全血在常温如25°C下放置30分钟-2小时，不要剧烈摇晃以免溶血，待全血自然凝固并析出血清后，4°C约1000-2000×g离心10分钟，取黄色上清即得血清，注意不要吸取白色或淡黄色沉淀；对于血浆样品，将全血用肝素或者EDTA进行抗凝，4°C约1000-2000×g离心10分钟，取黄色或淡黄色上清即得血浆，注意不要吸取白色沉淀。血清和血浆都需置于冰上，如果不能立即检测，也可以分装并短期保存于-20°C或-80°C。对于冻存的样品，在检测前解冻后冰浴存放备用，使用前必须混匀。
- 细胞或组织样品的准备：对于培养的贴壁细胞，PBS (C0221A)洗涤一次并吸净残留液体。对于培养的悬浮细胞，先适当离心(如100-500×g, 5分钟)收集细胞到离心管内，弃上清并吸净残留液体。按照每100万细胞加入100-200μl BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay的比例加入裂解液，适当吹打，冰浴5-10分钟以充分裂解细胞。4°C约12,000×g离心3-5分钟，取上清用于后续检测。对于组织样品，按照每10mg组织加入100μl BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay的比例，使用TissueMaster™高通量组织研磨仪(1.5/2ml×48)(E6618)、TissueMaster™手持式组织研磨仪(E6600)或玻璃匀浆器在约4°C或冰浴等低温条件下进行匀浆。4°C约12,000×g离心3-5分钟，取上清用于后续检测。以上所有操作均需在4°C或冰上操作。制备好的细胞或组织样品如果不能立即检测，可以-20°C或-80°C冻存。
- 细胞培养上清样品的准备：对于贴壁细胞，直接取培养液；对于悬浮细胞，离心取培养液。

2. 试剂盒的准备：

- 融解Amplex Red和Pyruvate Kinase Assay Buffer，平衡至室温后混匀备用。其它试剂存放于冰浴备用，使用完毕后宜立即按照试剂盒要求的条件保存。
- Amplex Red反应工作液(Working Solution)的配制：按照每个反应80μl的体积配制适量的Amplex Red反应工作液。均匀混

合72μl Pyruvate Kinase Assay Buffer、2μl Amplex Red、2μl Enzyme Mix、2μl Cofactor、2μl Substrate，即可配制成80μl Amplex Red反应工作液。根据待检测样品(包括标准品)的数量，配制适量的Amplex Red反应工作液。具体配制方法参考下表。配制好的Amplex Red反应工作液如果置于4°C或冰浴避光保存，可以在当天使用，但建议尽量现配现用。

Samples	1	10	20	50
Pyruvate Kinase Assay Buffer (μl)	72	720	1440	3600
Amplex Red (μl)	2	20	40	100
Enzyme Mix (μl)	2	20	40	100
Cofactor (μl)	2	20	40	100
Substrate (μl)	2	20	40	100
Working Solution (μl)	80	800	1600	4000

注1：由于酶溶液的用量较少且易沉降，必须注意在使用前先轻轻离心一下，然后适当混匀后再使用。

注2：丙酮酸和H₂O₂的存在会对丙酮酸激酶的检测产生干扰。如果样品含有丙酮酸或者H₂O₂，须同时设置背景对照孔，加入不含Substrate的Amplex Red反应工作液，即配制Amplex Red反应工作液时2μl Substrate用Phosphate Pyruvate Kinase Assay Buffer替代。计算时样品孔的读数需要减去对照孔的读数。

3. 样品测定：

- a. 丙酮酸标准曲线设置(吸光度或荧光检测，可选取其中的一种，对于样品量较少或浓度较低的情况，优先推荐采用荧光检测)。
 - (a) 吸光度检测：取5μl Pyruvate Standard (10mM)，加入95μl BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay或者Pyruvate Kinase Assay Buffer (如果检测BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay制备的细胞或组织样品，可以使用BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay；如果检测血液、上清等无需处理的样品，可以使用Pyruvate Kinase Assay Buffer)，混匀，配制浓度为500μM的丙酮酸标准溶液。分别取500μM的丙酮酸标准溶液0、4、8、12、16、20μl加入96孔板的标准品孔中，并相应地用BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay或Pyruvate Kinase Assay Buffer补足至20μl，此时，标准曲线的浓度分别为0、100、200、300、400、500μM。
注：吸光度检测时建议使用透明96孔板(FPT010/FPT011/FCP962)。
 - (b) 荧光检测：取2μl Pyruvate Standard (10mM)，加入98μl BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay或者Pyruvate Kinase Assay Buffer (如果检测BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay制备的细胞或组织样品，可以使用BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay；如果检测血液、上清等无需处理的样品，可以使用Pyruvate Kinase Assay Buffer)混匀，配制浓度为200μM的丙酮酸标准溶液。分别取200μM的丙酮酸标准溶液0、1、2、5、10、20μl加入96孔板的标准品孔中，并相应地用BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay或Pyruvate Kinase Assay Buffer补足至20μl，此时，标准曲线的浓度分别为0、10、20、50、100、200μM。
注：荧光检测时建议使用96孔黑板(FCP965/FCP966)。
- b. 取1-20μl样品或稀释后的样品至96孔板样品孔中，并相应地加入BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay或Pyruvate Kinase Assay Buffer至样品孔中，补足至20μl。同时设置仅含BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay或Pyruvate Kinase Assay Buffer的孔为**空白对照**。
注：为确保样品数值在标准曲线范围内，建议进行预实验将样品设置多个稀释倍数，以确定样品中丙酮酸激酶的大致活力，如果数值不在标准曲线范围内，请调整样品的稀释倍数或者样品的量。如果检测BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay制备的细胞或组织裂解样品，请使用BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay稀释；如果检测血液、上清等无需裂解处理的样品，可以使用Pyruvate Kinase Assay Buffer稀释。样品总稀释倍数记为n (例如本步骤中对样品进行了10倍稀释，加入的‘稀释后的样品’为10μl，则n=10×20/10=20)。
- c. 各孔加入Amplex Red反应工作液80μl，混匀，37°C避光反应T₁ (通常为2-3分钟)。
- d. 如果使用吸光度检测，测定A₅₇₀，记为A₁；如果使用荧光检测，设置激发波长为560nm，发射波长为590nm进行荧光强度检测，记为RFU₁。
- e. 继续37°C避光反应T₂ (通常为20-30分钟)，测定A₅₇₀，记为A₂，或者设置激发波长为560nm、发射波长为590nm进行荧光强度检测，记为RFU₂。信号的增强取决于丙酮酸激酶催化产生的丙酮酸的量， $\Delta A = A_2 - A_1$ ， $\Delta RFU = RFU_2 - RFU_1$ 。
注：如果吸光度偏低或荧光偏弱，可适当延长反应时间，例如反应45或60分钟。
- f. 建立标准曲线，将 ΔA 或 ΔRFU 带入标准曲线，即可算出在反应时间内样品中丙酮酸激酶催化产生的丙酮酸浓度(A)，如果样品的背景对照信号比较高，样品的信号值应减去样品背景对照的信号值。丙酮酸标准曲线可以参考图2，吸光度检测在10-500μM浓度范围内有良好的线性关系，荧光检测在1-200μM浓度范围内有良好的线性关系。丙酮酸激酶活力的计算公式如下：
$$PK (U/L) = B \times n / (T_2 - T_1)$$

注：B为步骤3f根据标准曲线确定的丙酮酸浓度(μM)；
n为步骤3b样品总稀释倍数。
丙酮酸激酶活力单位的定义：1个酶活力单位(unit, U)在37°C条件下，在1分钟内可以生成1μmol丙酮酸。

参考文献：

1. Miwa S, Fujii H. Clin Biochem. 1990. 23(2):155-7.
2. Israelsen WJ, Vander Heiden MG. Semin Cell Dev Biol. 2015. 43:43-51.

相关产品:

产品编号	产品名称	包装
C0016/C0017	乳酸脱氢酶细胞毒性检测试剂盒	100次/500次
C0018S/M	乳酸脱氢酶细胞毒性检测试剂盒(WST-8法)	100次/500次
S0110S	黄嘌呤氧化酶活性检测试剂盒(WST-8法)	100次
S0111S	黄嘌呤氧化酶抑制剂筛选试剂盒(WST-8法)	100次
S0112S/M	Amplex Red黄嘌呤氧化酶活性检测试剂盒	100次/500次
S0113S	Amplex Red黄嘌呤氧化酶抑制剂筛选试剂盒	100次
S0114S	黄嘌呤/次黄嘌呤检测试剂盒(WST-8法)	100次
S0204S	D-乳酸检测试剂盒(WST-8法)	100次
S0208S	L-乳酸检测试剂盒(WST-8法)	100次
S0211S/M	Amplex Red胆固醇与胆固醇酯检测试剂盒	100次/500次
S0215S/M	Amplex Red游离脂肪酸检测试剂盒	100次/500次
S0219S/M	Amplex Red甘油三酯检测试剂盒	100次/500次
S0223S/M	Amplex Red甘油检测试剂盒	100次/500次
S0227S	Amplex Red L-乳酸检测试剂盒	100次
S0231S	Amplex Red尿酸与尿酸酶检测试剂盒	100次
S0235S	Amplex Red磷酸盐检测试剂盒	100次
S0239S	Amplex Red乙醇检测试剂盒	100次
S0243S/M	Amplex Red黄嘌呤/次黄嘌呤检测试剂盒	100次/500次
S0247S	Amplex Red谷氨酸与谷氨酸氧化酶检测试剂盒	100次
S0251S	Amplex Red过氧化氢与过氧化物酶检测试剂盒	100次
S0255S	Amplex Red过氧化氢酶检测试剂盒	100次
S0259S	Amplex Red单胺氧化酶检测试剂盒	100次
S0263S	Amplex Red鞘磷脂酶检测试剂盒	100次
S0267S	Amplex Red胆碱与乙酰胆碱检测试剂盒	100次
S0271S	Amplex Red乙酰胆碱酯酶检测试剂盒	100次
S0275S	Amplex Red磷脂酰胆碱检测试剂盒	100次
S0279S	Amplex Red磷脂酶D检测试剂盒	100次
S0283S	Amplex Red肌酸检测试剂盒	100次
S0287S	Amplex Red肌酸激酶检测试剂盒	100次
S0291S	Amplex Red肌酐检测试剂盒	100次
S0295S	Amplex Red肌氨酸检测试剂盒	100次
S0299S	Amplex Red丙酮酸检测试剂盒	100次
S0303S	Amplex Red丙酮酸激酶检测试剂盒	100次
S0307S	Amplex Red ADP检测试剂盒	100次
S0311S	Amplex Red磷酸烯醇式丙酮酸检测试剂盒	100次
S0315S	Amplex Red丙氨酸检测试剂盒	100次
S0319S	Amplex Red丙氨酸转氨酶检测试剂盒	100次
S0323S	Amplex Red α -酮戊二酸检测试剂盒	100次
S0327S	Amplex Red天冬氨酸检测试剂盒	100次
S0331S	Amplex Red天冬氨酸氨基转移酶检测试剂盒	100次
S0335S	Amplex Red柠檬酸检测试剂盒	100次
S0339S	Amplex Red草酰乙酸检测试剂盒	100次
S0343S	Amplex Red葡萄糖检测试剂盒	100次
S0347S	Amplex Red葡萄糖氧化酶检测试剂盒	100次
S0351S	Amplex Red果糖检测试剂盒	100次
S0355S	Amplex Red乳糖检测试剂盒	100次
S0359S	Amplex Red半乳糖与乳糖检测试剂盒	100次
S0363S	Amplex Red半乳糖与半乳糖氧化酶检测试剂盒	100次
S0367S	Amplex Red麦芽糖检测试剂盒	100次
S0371S	Amplex Red麦芽糖与葡萄糖检测试剂盒	100次

S0375S	Amplex Red糖原检测试剂盒	100次
S0379S	Amplex Red磷酸果糖激酶检测试剂盒	100次
S0383S	Amplex Red乙酰辅酶A检测试剂盒	100次
S0387S	Amplex Red辅酶A检测试剂盒	100次
S0391S	Amplex Red乙酰辅酶A合成酶检测试剂盒	100次
S0511S	L-苹果酸检测试剂盒(WST-8法)	100次
S0514S	苹果酸脱氢酶活性检测试剂盒(WST-8法)	100次
S0517S	延胡索酸检测试剂盒(WST-8法)	100次
S0520S	延胡索酸酶活性检测试剂盒(WST-8法)	100次
S0523S	异柠檬酸检测试剂盒(WST-8法)	100次
S0526S	异柠檬酸脱氢酶活性检测试剂盒(WST-8法)	100次
S0529S	Amplex Red琥珀酸检测试剂盒	100次
S0530S	琥珀酸脱氢酶活性检测试剂盒(显色法)	100次
S0532S	Amplex Red琥珀酰辅酶A合成酶检测试剂盒	100次
S0535S	支链氨基酸检测试剂盒(WST-8法)	100次
S0538S	N-乙酰氨基葡萄糖苷酶活性检测试剂盒(显色法)	100次
S0540S	酪氨酸检测试剂盒(显色法)	100次
S0542S	酪氨酸酶活性检测试剂盒(显色法)	100次
S0545S	酪氨酸酶抑制剂筛选试剂盒(显色法)	100次
S0547S	髓过氧化物酶活性检测试剂盒(显色法)	100次
S0548S	Amplex Red髓过氧化物酶活性检测试剂盒	100次
S0550S	Amplex Red髓过氧化物酶抑制剂筛选试剂盒	100次

Version 2024.09.06