

丙酮酸激酶（PK）测试盒（测红细胞）

比色法：50 管/48 样

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。

二、试剂组成与配制：

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 7 天。

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 320μl，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 650μl，用不完-20℃以下保存。

试剂六：稳定剂 20ml×1 瓶，4℃保存。

三、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)。

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试试剂进行血红蛋白 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。

四、酶活力的计算:

1、单位定义:

在 37℃, pH7.6 的条件下, 每克 Hb 每分钟将 1 μ mol 的 PEP 转变成丙酮酸为一个酶活力单位。

2、计算公式:

$$\begin{aligned}
 \text{丙酮酸激酶活力} &= \frac{A_1 - A_2}{\text{毫摩尔消光系数} \times \text{反应时间} \times \text{比色光径}} \times \frac{1}{\text{取样量}} \times \frac{\text{反应液总体积}}{\text{溶血液血红蛋白含量}} \\
 (U/gHb) &= \frac{A_1 - A_2}{6.22 \times 15 \times 0.5} \times \frac{1}{0.02} \times \frac{1.195}{\text{溶血液血红蛋白含量}} \\
 &= \frac{A_1 - A_2}{0.02} \times 1.195 \div \text{溶血液血红蛋白含量} \quad (gHb/ml)
 \end{aligned}$$

