

果糖-6-磷酸激酶（6-phosphofructokinase, PFK）试剂盒说明书

(货号：ADS-F-T003 分光法 48 样)

一、产品简介：

果糖-6-磷酸激酶（PFK, EC 2.7.1.11）广泛存在于动物、植物、微生物和培养细胞中，是糖酵解过程的关键酶之一。

PFK 催化果糖-6-磷酸和 ATP 生成果糖-1,6-二磷酸和 ADP，丙酮酸激酶和乳酸脱氢酶进一步依次催化 NADH 氧化生成 NAD⁺，在 340nm 下测定 NADH 下降速率，即可反映 PFK 活性大小。

二、试剂盒的组成和配制：

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 60mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	液体 24mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	粉剂 1 瓶	-20°C保存	用前甩几下使试剂落入底部，再加 8.4mL 的蒸馏水溶解。
试剂三	粉剂 4 支	-20°C保存	用前甩几下使试剂落入底部，每支加 0.6mL 的蒸馏水溶解，用不完的试剂分装后-20°C保存，禁止反复冻融，三天内用完。
试剂四	粉剂 2 支	-20°C保存	临用前甩几下使粉剂落入底部，每支再加 0.6mL 蒸馏水充分溶解备用，可分装冻存，禁止反复冻融。
试剂五	粉剂 2 支	-20°C保存	临用前甩几下使粉剂落入底部，每支再加 0.6mL 蒸馏水充分溶解备用，可分装冻存，禁止反复冻融。

三、所需的仪器和用品：

紫外分光光度计、1mL 石英比色皿（光径 1cm）、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

四、果糖-6-磷酸激酶（PFK）酶活测定：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

1、样本制备：

① 组织样本：称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液，进行冰浴匀浆。12000rpm，4°C离心 10min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照组织质量（g）：提取液体积（mL）为 1：5~10 的比例进行提取。

② 细菌/细胞样本：先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；取 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液；冰浴超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 20%或 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；12000rpm，4°C离心 10min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照细菌/细胞数量（10⁴个）：提取液（mL）为 1:1000~5000 比例进行提取。

③ 血清样本：直接检测。

2、上机检测：

① 紫外分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 340nm，蒸馏水调零。

② 所有试剂可放在 37°C水浴 5-15min。

- ③ 试剂一和二和三和四和五可按照 400:150:40:20:20 比例配成混合液（一枪加 630 μ L 该混合液）（该混合液用多少配多少，现配现用）。
- ④ 依次在 1mL 石英比色皿（光径 1cm）中加入：

试剂名称 (μ L)	测定管
试剂一	400
试剂二	150
试剂三	40
试剂四	20
试剂五	20
混匀，37 $^{\circ}$ C下，孵育 5min 后。	
样本	80
混匀，10s 时于 340nm 处读取吸光值 A1，5min 后读取吸光值 A2， $\Delta A=A1-A2$ 。	

- 【注】** 1.若 ΔA 小于 0.01 附近，可以适当延长反应时间 T（如增至 20min 或更长读取 A2）；或适当加大样本加样量 V1（如增至 150 μ L，则试剂一相应减少）；或增加样本取样质量 W；则改变后的 T 和 V1 和 W 需代入计算公式重新计算。
2. 若 A1 太大如超过 2（如颜色较深的植物叶片，一般色素较高，则起始值会偏高）可减少样本加样体积 V1（如减至 40 μ L，则补充 40 μ L 蒸馏水或试剂一），则改变后 V1 需代入公式重新计算。或向待测样本中加少许活性炭混匀静置 5min 后 12000rpm, 4 $^{\circ}$ C 离心 10min，上清液用于检测。
- 3.若 A1 值低于 0.6 或 ΔA 大于 0.6，可减少样本加样体积 V1（如减至 40 μ L，则补充 40 μ L 蒸馏水或试剂一）或减少反应时间 T（如减至 2min 后读取 A2），则改变后的 V1 和 T 代入计算公式重新计算。
- 4.若下降趋势不稳定，可以每隔 10S 读取一次吸光值，选取一段线性下降的时间段来参与计算，相对应的 A 值也代入计算公式重新计算。

五、结果计算：

1、按样本蛋白浓度计算：

酶活定义：每毫克组织蛋白每分钟催化 1nmol 果糖-6-磷酸和 1nmolATP 转化为 1nmol 果糖-1,6-二磷酸和 1nmol ADP 定义为一个酶活力单位。

$$PFK(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot})=[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times 10^9] \div (\text{Cpr} \times V_1 \div V) \div T = 285.4 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

2、按样本鲜重计算：

酶活定义：每克组织每分钟催化 1nmol 果糖-6-磷酸和 1nmolATP 转化为 1nmol 果糖-1,6-二磷酸和 1nmol ADP 定义为一个酶活力单位。

$$PFK(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重})=[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times 10^9] \div (W \times V_1 \div V) \div T = 285.4 \times \Delta A \div W$$

3、按细菌/细胞密度计算：

酶活定义：每 1 万个细菌或细胞每分钟催化 1nmol 果糖-6-磷酸和 1nmolATP 转化为 1nmol 果糖-1,6-二磷酸和 1nmol ADP 定义为一个酶活力单位。

$$PFK(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell})=[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times 10^9] \div (500 \times V_1 \div V) \div T = 0.571 \times \Delta A$$

4、血清 PFK 活力计算：

酶活定义：每毫升血清每分钟催化 1nmol 果糖-6-磷酸和 1nmolATP 转化为 1nmol 果糖-1,6-二磷酸和 1nmol ADP 定义为一个酶活力单位。

$$PFK(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL})=[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times 10^9] \div V_1 \div T = 285.4 \times \Delta A$$

ϵ ---NADH 摩尔消光系数，6.22 $\times 10^3$ L / mol /cm； d---光径，1cm；

V---加入提取液体积，1 mL；

V1---加入样本体积，0.08 mL；

V2---反应体系总体积, 7.1×10^4 L;

T---反应时间, 5min;

500---细菌或细胞总数, 500 万;

W---样本质量, g;

Cpr---样本蛋白质浓度, mg/mL; 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。

