

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

（货号：ADS-W-T003 微板法 96 样 有效期：3 个月）

一、指标介绍：

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：

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 120mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 12mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉剂 1 瓶	-20℃保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部（可手动甩一甩）； 2. 加入 4.2mL 的蒸馏水溶解备用； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂三	粉剂 4 支	-20℃保存	每支： 1. 临用前 8000g 4℃离心 2min 使粉剂落入管底（可手动甩一甩）； 2. 加入 0.55mL 的蒸馏水溶解备用； 3. 用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融，三天内用完。
试剂四	粉剂 2 支	-20℃保存	每支： 1. 临用前 8000g 4℃离心 2min 使粉剂落入管底（可手动甩一甩）； 2. 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； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂五	液体 2 支	-20℃保存	每支： 1. 临用前 8000g 4℃离心 2min 使试剂落入管底（可手动甩一甩）； 2. 每支再加 0.6mL 蒸馏水充分混匀备用，可分装冻存，禁止反复冻融； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。

三、实验器材：

研钵（匀浆机）、冰盒（制冰机）、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅（烘箱、培养箱、金属浴）、96孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

四、指标测定：

建议先选取 1-3 个差异大的样本（例如不同类型或分组）进行预实验，熟悉操作流程，根据预实验结果确定或调整样本浓度，以防造成样本或试剂不必要的浪费！

1、样本提取：

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℃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℃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（ 10^4 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、检测步骤：

① 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 340nm。

② 所有试剂可放在 37℃水浴 5-15min。

③ 试剂一和二和三和四和五可按照 100:40:20:10:10 比例配成混合液（一枪加 180μL 该混合液）（该混合液用多少配多少，现配现用）。

④ 依次在 96 孔板中加入：

试剂组分（μL）	测定管
试剂一	100
试剂二	40
试剂三	20
试剂四	10
试剂五	10
混匀，37℃下，孵育 5min 后。	
样本	20
混匀，37℃下，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 50μL，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.若起始值 A1 太大如超过 2（如颜色较深的植物叶片，一般色素较高，则起始值相对会偏高），可以适当减少样本加样 V1（如由 20μL 减至 10μL，则补充 10μL 蒸馏水或试剂一），则改变后的 V1 需代入计算公式重新计算。或向待测样本中加少许活性炭混匀静置 5min 后 12000rpm，4℃离心 10min，上清液用于检测。

3.若 A1 值低于 0.6 或 A2 值在 0.25 附近或 ΔA 大于 0.6，可减少样本加样体积 V1（如减至 10μL，则补充 10μL 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。

$$\text{PFK}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot})=[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times 10^9] \div (\text{Cpr} \times V_1 \div V) \div T = 643.1 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

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。

$$\text{PFK}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重})=[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times 10^9] \div (W \times V_1 \div V) \div T = 643.1 \times \Delta A \div W$$

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。

$$\text{PFK}(\text{nmol}/\text{min} / 10^4 \text{ cell})=[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times 10^9] \div (500 \times V_1 \div V) \div T = 1.29 \times \Delta A$$

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。

$$\text{PFK}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL})=[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times 10^9] \div V_1 \div T = 643.1 \times \Delta A$$

ϵ ---NADH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3 \text{ L} / \text{mol} / \text{cm}$ ；
 d ---96 孔板光径，0.5cm；
 V ---加入提取液体积，1 mL；
 V_1 ---加入样本体积，0.02 mL；
 V_2 ---反应体系总体积， $2 \times 10^{-4} \text{ L}$ ；
 T ---反应时间，5 min；
 500 ---细菌或细胞总数，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。