

磷酸果糖激酶(PFK)活性检测试剂盒说明书

Phosphofructokinase Assay Kit

紫外分光光度法

货号: AK094

规格: 50T/48S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
提取液 ES07	60ml×1 瓶	4℃保存;
AK094-A	45ml×1 瓶	4℃保存;
AK094-B	粉剂×1 瓶	-20℃保存; 临用前加入 2.8mL 双蒸水充分溶解备用, -20℃分装保存, 避免反复冻融;
AK094-C	粉剂×1 支	-20℃保存; 临用前加入 3ml 蒸馏水充分溶解备用, -20℃分装保存, 避免反复冻融;
AK094-D	粉剂×1 支	-20℃保存; 临用前加入 3ml 蒸馏水充分溶解备用, -20℃分装保存, 避免反复冻融;
PFK 工作液(可测 25 个样)的配制: 取 20mL AK094-A 和 1.32mL AK-094-B 充分混匀, 现用现配。		

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介:

意义: 磷酸果糖激酶 (Phosphofructokinase, PFK; EC 2.7.1.11) 广泛存在于动物、植物、微生物和培养细胞中, 负责将果糖-6-磷酸和 ATP 转化为果糖-1,6-二磷酸和 ADP, 是糖酵解过程的关键调节酶之一。

原理: 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。

自备用品:

紫外分光光度计、1ml 石英比色皿、水浴锅、可调式移液枪、研钵、冰和双蒸水。

粗酶液提取:

1. 细菌或培养细胞: 先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 按照细菌或细胞数量 (10^4 个): 提取液 ES07 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液 ES07, 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); 然后 8000g 4℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。
2. 组织: 按照组织质量 (g): 提取液 ES07 体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液), 进行冰浴匀浆; 8000g 4℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。
3. 血清 (浆) 样品: 直接检测。

测定步骤:

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. 试剂准备见产品组成及保存条件列表。
3. 样本测定, 依次在 1 mL 石英比色皿中加入下列试剂:

试剂名称	测定管 (ul)
PFK 工作液	850
样本	50

AK094-C	50
AK094-D	50
将上述试剂按顺序加入 1 mL 石英比色皿中，加 AK094-D 的同时开始计时；在 340 nm 波长下记录 20 秒时的初始吸光度 A1，比色后迅速将比色皿连同反应液一起放入 37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）水浴中，准确反应 10 分钟；迅速取出比色皿并擦干，340 nm 下比色，记录 10 分 20 秒时的吸光度 A2，计算 $\Delta A=A_1-A_2$ 。	

PFK 酶活性计算：

1. 血清（浆）PFK 活力的计算：

单位的定义：每毫升血清（浆）每分钟催化 1nmol 果糖-6-磷酸和 1nmol ATP 转化为 1nmol 果糖-1,6-二磷酸和 1nmol ADP 定义为一个酶活力单位。

计算公式：PFK (U/mL) = $[\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 321 \times \Delta A$

2. 组织、细菌或细胞中 PFK 活力计算：

（1）按样本蛋白浓度计算：

单位的定义：单位的定义：每 mg 组织蛋白在反应体系中每分钟催化 1nmol 果糖-6-磷酸和 1nmol ATP 转化为 1nmol 果糖-1,6-二磷酸和 1nmol ADP 定义为一个酶活力单位。

计算公式：PFK (U/mg pro) = $[\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T = 321 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$

（2）按样本鲜重计算

单位的定义：每 g 组织在反应体系中每分钟催化 1nmol 果糖-6-磷酸和 1nmol ATP 转化为 1nmol 果糖-1,6-二磷酸和 1nmol ADP 定义为一个酶活力单位。

计算公式：PFK (U/g 鲜重) = $[\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 321 \times \Delta A \div W$

（3）按细菌或细胞密度计算

单位的定义：每 1 万个细菌或细胞在反应体系中每分钟催化 1nmol 果糖-6-磷酸和 1nmol ATP 转化为 1nmol 果糖-1,6-二磷酸和 1nmol ADP 定义为一个酶活力单位。

计算公式：PFK (U/10⁴ cell) = $[\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.64 \times \Delta A$

注： V_{反总}：反应体系总体积，10⁻³L； ϵ ：NADH 摩尔消光系数，6.22×10³L/mol/cm；d：比色皿光径，1 cm；V_样：加入样本体积，0.05mL；V_{样总}：加入提取液体积，1mL；T：反应时间，10min；C_{pr}：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；500：细菌或细胞总数，500 万；10⁹：单位换算系数，1mol=10⁹nmol。

注意事项：

1. 比色皿中反应液的温度必须保持 37℃或 25℃，取小烧杯一只装入一定量的 37℃或 25℃蒸馏水，将此烧杯放入 37℃或 25℃水浴锅中，在反应过程中把比色皿连同反应液放在此烧杯中预热。
2. 测定过程中 AK094-C、AK094-D 和样本在冰上放置，以免变性和酶失活。
3. 不同匀浆组织中 PFK 活力不一样，做正式试验之前请做 1-2 次预试验，若 $\Delta A > 0.5$ ，则说明活力太高，必须用提取液 ES07 稀释成适当浓度匀浆上清液（计算公式中乘以相应稀释倍数），或缩短反应时间至 2min 或 5min，使 $\Delta A < 0.5$ ，以提高检测灵敏度。
4. 最好两个人同时做此实验，一个人比色，一个人计时，以保证实验结果的准确性。