

## 磷酸果糖激酶(PFK)活性检测试剂盒说明书

### Phosphofructokinase Assay Kit

微量法

货号: AK095

规格: 100T/96S

产品组成及保存条件:

| 编号  | 规格        | 储存条件  |
|---|-----------|---|
| 提取液 ES07  | 100ml×1 瓶 | 4℃保存;   |
| AK095-A   | 20ml×1 瓶  | 4℃保存;   |
| AK095-B   | 粉剂×1 瓶    | -20℃保存; 临用前加入 1.13mL 双蒸水充分溶解备用, -20℃分装保存, 避免反复冻融; |
| AK095-C   | 粉剂×1 支    | -20℃保存; 临用前加入 1ml 蒸馏水充分溶解备用, -20℃分装保存, 避免反复冻融;    |
| AK095-D   | 粉剂×1 支    | -20℃保存; 临用前加入 1ml 蒸馏水充分溶解备用, -20℃分装保存, 避免反复冻融;    |
| PFK 工作液的配制: 取 17mL AK095-A 和溶解后的 AK095-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<sup>+</sup>, 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/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔板、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<sup>4</sup> 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. 紫外分光光度计或酶标仪预热 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 | 170      |
| 样本      | 10       |
| AK095-C | 10       |

|   |    |
|---|----|
| AK095-D   | 10 |
| 将上述试剂按顺序加入，加 AK095-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 $\Delta A = A1 - A2$ 。 |    |

### PFK 酶活性计算：

#### a. 微量比色皿：

##### 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。

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

##### 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。

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

###### （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。

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

###### （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。

$$\text{计算公式：PFK (U/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.64 \times \Delta A$$

**注：** V 反总：反应体系总体积， $2 \times 10^{-4}$  L； $\epsilon$ ：NADH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3$  L/mol/cm；d：比色皿光径，1 cm；V 样：加入样本体积，0.01 mL；V 样总：加入提取液体积，1 mL；T：反应时间，10 min；Cpr：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； $10^9$ ：单位换算系数， $1 \text{ mol} = 10^9 \text{ nmol}$ 。

#### b. 96 孔板：

##### 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。

$$\text{计算公式：PFK (U/mL)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 642 \times \Delta A$$

##### 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。

$$\text{计算公式：PFK (U/mg pro)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (Cpr \times V_{\text{样}}) \div T = 642 \times \Delta A \div Cpr$$

(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 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。

计算公式：PFK (U/g 鲜重) =  $[\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 642 \times \Delta A \div W$

(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/ $10^4$  cell) =  $[\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1.28 \times \Delta A$

注：V 反总：反应体系总体积， $2 \times 10^{-4}$ L； $\epsilon$ ：NADH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3$ L/mol/cm；d：比色皿光径，0.5cm；V 样：加入样本体积，0.01mL；V 样总：加入提取液体积，1mL；T：反应时间，10min；Cpr：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； $10^9$ ：单位换算系数， $1\text{mol}=10^9\text{nmol}$ 。

**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 AK095-C、AK095-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。