

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⁺，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：

- 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 (10⁴ 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。）
- 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。
- 血清（浆）样品：直接检测。

测定步骤：

- 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。
- 试剂准备见产品组成及保存条件列表。
- 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。

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

(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。

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

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

注： $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, $2 \times 10^{-4} \text{ L}$; ϵ : NADH 摩尔消光系数, $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$; d : 比色皿光径, 1 cm; $V_{\text{样}}$: 加入样本体积, 0.01mL; $V_{\text{样总}}$: 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, $1\text{mol}=10^9\text{nmol}$ 。

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。

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

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

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

注： $V_{\text{反总}}$ ：反应体系总体积， $2 \times 10^{-4} \text{ L}$; ϵ ：NADH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$; d ：比色皿光径，0.5cm; $V_{\text{样}}$ ：加入样本体积，0.01mL; $V_{\text{样总}}$ ：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; 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。