

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

微量法 100管/96样

正式测定前务必取2-3个预期差异较大的样本做预测定

测定意义

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。

测定原理

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。

需自备的仪器和用品

紫外分光光度计/酶标仪、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、微量石英比色皿/96孔板、研钵、冰和蒸馏水。

试剂的组成和配制

提取液：100mL×1瓶，4℃保存；

试剂一：液体20mL×1瓶，4℃保存；

试剂二：粉剂×1瓶，-20℃保存；

试剂三：粉剂×1支，4℃保存；

试剂四：液体8μL×1支，4℃保存；

样本的前处理

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（10⁴个）：提取液体积（mL）为1000~5000：1的比例（建议2000万细菌或细胞加入1mL提取液），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）；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. 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. 样本测定

（1）在试剂二瓶中加入17mL试剂一和1.13mL蒸馏水充分溶解，置于37℃（哺乳动物）或25℃（其它物种）水浴5min；用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融；

（2）在试剂三中加入1mL蒸馏水充分混匀，冰上放置备用；用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融；

（3）在试剂四中加入1mL蒸馏水充分混匀，冰上放置待用；用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融；

（4）在微量石英比色皿或96孔板中加入10μL样本、10μL试剂三、10μL试剂四和170μL试剂二，混匀，立即记录340nm处20s时的吸光值A₁和10min20s后的吸光值A₂，计算ΔA=A₁-A₂。

注意：不同匀浆组织中PFK活力不一样，做正式试验之前请做1-2只预试，若ΔA>0.5，则说明活力太高，必须用提取液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。

PFK活力单位的计算

a.用微量石英比色皿测定的计算公式如下

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。

$$\text{PFK (nmol/min/mL)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div V_{\text{样}} \div T = 321 \times \Delta A$$

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。

$$\text{PFK (nmol/min /mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 321 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

(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。

$$\text{PFK (nmol/min /g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 321 \times \Delta A \div W$$

(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。

$$\text{PFK (nmol/min /104 cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (2000 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.1605 \times \Delta A$$

V反总：反应体系总体积， 2×10^{-4} L； ϵ ：NADH摩尔消光系数， 6.22×10^3 L / mol /cm；d：比色皿光径，1cm；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；2000：细菌或细胞总数，2000万。

b.用96孔板测定的计算公式如下

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。

$$\text{PFK (nmol/min/mL)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div V_{\text{样}} \div T = 642 \times \Delta A$$

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。

$$\text{PFK (nmol/min /mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 642 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

(2) 按样本鲜重计算

单位的定义：每g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。

$$\text{PFK (nmol/min /g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 642 \times \Delta A \div W$$

(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。

$$\text{PFK (nmol/min /104 cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (2000 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.321 \times \Delta A$$

V反总：反应体系总体积， 2×10^{-4} L； ϵ ：NADH摩尔消光系数， 6.22×10^3 L / mol /cm；d：96孔板光径，0.5cm；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；2000：细菌或细胞总数，2000万。

www.affandi-e.com