

上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0397

Size: 100T/96S

磷酸果糖激酶 (PFK) 检测试剂盒说明书

微量法

*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

一、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。

二、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。

三、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 (ZC-1036: UV板)、研钵、冰和蒸馏水。

四、试剂的组成和配置:

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
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	粉体×1 支	4℃保存	

五、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（ 10^4 个）：提取液体积（mL）为500~1000：1的比例（建议500万细菌或细胞加入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。

六、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；现配现用；
 - （2）在试剂三中加入1mL蒸馏水充分混匀，冰上放置备用；现配现用；
 - （3）在试剂四中加入1mL蒸馏水充分混匀，冰上放置待用；现配现用；
 - （4）在微量石英比色皿或 96 孔板（UV 板）中加入 10 μ L 样本、10 μ L 试剂三、10 μ L 试剂四和 170 μ L 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 $\Delta A=A1-A2$ 。

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 $\Delta A>0.5$ ，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。

七、PFK 活力单位的计算

● 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。

$$\text{PFK (nmol/min/mL)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 321 \times \Delta A$$

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。

$$\text{PFK (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 321 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

(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。

$$\begin{aligned} \text{PFK (nmol/min/g 鲜重)} &= [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 321 \times \Delta A \div W \end{aligned}$$

(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。

$$\begin{aligned} \text{PFK (nmol/min/10}^4\text{cell)} &= [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 0.642 \times \Delta A \end{aligned}$$

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，1mL；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。

● 用96孔板（UV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。

$$\text{PFK (nmol/min/mL)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 642 \times \Delta A$$

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。

$$\text{PFK (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 642 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

(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。

$$\begin{aligned} \text{PFK (nmol/min/g 鲜重)} &= [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 642 \times \Delta A \div W \end{aligned}$$

(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。

$$\text{PFK (nmol/min/10}^4\text{cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$
$$= 1.284 \times \Delta A$$

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 (UV 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; 500:
细菌或细胞总数, 500 万。