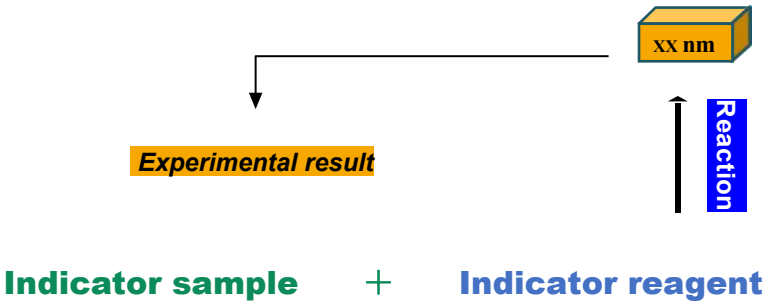
上海茁彩生物科技有限公司

Shanghai zcibio technology Co.,Ltd.



生化检测原理示意图

货号：ZC-S0397　　规格：100管/96样

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

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（UV板）、研钵、冰和蒸馏水。

试剂的组成和配制

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	液体×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（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。

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 ΔA<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。

PFK（nmol/min/mL）＝[ΔA×V 反总÷（ε×d）×10^9]÷V 样÷T=321×ΔA

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。

PFK（nmol/min/mg prot）＝[ΔA×V 反总÷（ε×d）×10^9]÷(V 样×Cpr）÷T

=321×ΔA÷Cpr

（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。

PFK（nmol/min/g 鲜重）＝[ΔA×V 反总÷（ε×d）×10^9]÷(W ×V 样÷V 样总)÷T

=321×ΔA÷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。

PFK（nmol/min/10^4cell）＝[ΔA×V反总÷（ε×d）×10^9]÷(500×V样÷V样总)÷T

=0.642×ΔA

V 反总：反应体系总体积，2×10^{-4} L；ε：NADH 摩尔消光系数，6.22×10^3L/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。

b.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。

PFK（nmol/min/mL）＝[ΔA×V 反总÷（ε×d）×10^9]÷V 样÷T=642×ΔA

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。

PFK（nmol/min/mg prot）＝[ΔA×V 反总÷（ε×d）×10^9]÷(V 样×Cpr) ÷T

=642×ΔA÷Cpr

（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。

PFK（nmol/min/g 鲜重）＝[ΔA×V 反总÷（ε×d）×10^9]÷(W× V 样÷V 样总)÷T

=642×ΔA÷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。

PFK（nmol/min/10^4cell）＝[ΔA×V反总÷（ε×d）×10^9]÷(500×V样÷V样总)÷T

=1.284×ΔA

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。