

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

磷酸果糖激酶（PFK）活性检测试剂盒说明书

紫外分光光度法

注意：正式测定之前选择2-3个预期差异大的样本做预测定。

产品内容：

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液	液体 60mL×1 瓶	4℃保存	-
试剂一	液体 40mL×1 瓶	4℃保存	-
试剂二	粉剂×1 瓶	-20℃保存	临用前加入 2.8mL 双蒸水充分溶解备用
试剂三	液体×1 支	-20℃保存	临用前加入 260μL 双蒸水充分溶解备用
试剂四	液体×1 支	4℃保存	临用前加入 260μL 双蒸水充分溶解备用
PFK 工作液（可测 25 个样）的配制：取 19mL 试剂一和 1.26mL 试剂二充分混匀。			

产品说明：

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。

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、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、1 mL 石英比色皿、研钵、冰和蒸馏水。

操作步骤：

一、样本的前处理

1、细菌、细胞或组织样品的制备

细菌或细胞处理：收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；按照每 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液，超声波破碎细菌或细胞（功率 20%，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；8000g 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

组织处理：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。

2、血清（浆）样品：直接检测。

二、测定步骤

1. 分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 340nm，蒸馏水调零。

试剂名称 (μL)	测定管
PFK 工作液	800
样本	30
试剂三	5
试剂四	5

将上述试剂按顺序加入 1 mL 石英比色皿中，加样本的同时开始计时；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°C（哺乳动物）或 25°C（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 $\Delta A = A1 - A2$ 。

注意事项

- 1、测定过程中试剂三、试剂四和样本在冰上放置，以免变性和失活。
- 2、比色皿中反应液的温度必须保持 37°C 或 25°C，取小烧杯一只装入一定量的 37°C 或 25°C 蒸馏水，将此烧杯放入 37°C 或 25°C 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。
- 3、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。
- 4、若 ΔA 大于 0.5，需将酶液用酶提取液稀释，使 ΔA 小于 0.5，可提高检测灵敏度。

三、PFK 活力单位的计算：

1、血清（浆）PFK 活力的计算：

单位的定义：每毫升血清（浆）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。PFK

$$(U/mL) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 450 \times \Delta A$$

2、组织、细菌或细胞中 PFK 活力的计算：

(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。

$$PFK (U/mg \text{ prot}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T = 450 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

(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。

$$PFK (U/g \text{ 鲜重}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 450 \times \Delta A \div W$$

(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。

$$PFK (U/10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.9 \times \Delta A$$

V 反总：反应体系总体积， $8.4 \times 10^{-4} \text{L}$ ； 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 样：加入样本体积，0.03mL；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， $1 \text{mol} = 10^9 \text{nmol}$ 。