

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

(货号: G0808W48 微板法 48 样)

一、产品简介:

果糖-6-磷酸激酶 (PFK, EC 2.7.1.11) 广泛存在于动物、植物、微生物和培养细胞中, 是糖酵解过程的关键酶之一。

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 活性大小。

二、试剂盒的组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 60mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	液体 6mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	液体 2.2mL×1 支	-20°C保存	该试剂可分装后于-20°C保存 (尽量避免反复冻融)。
试剂三	粉剂 mg×2 支	-20°C保存	每支用前甩几下使试剂落入底部, 再加 0.55mL 的蒸馏水溶解备用。用不完的试剂分装后-20°C保存, 禁止反复冻融, 三天内用完。
试剂四	粉剂 mg×1 支	-20°C保存	临用前甩几下使粉剂落入底部, 再加 0.6mL 蒸馏水充分溶解备用, 可分装冻存, 禁止反复冻融。
试剂五	粉剂 mg×1 支	-20°C保存	临用前甩几下使粉剂落入底部, 再加 0.6mL 蒸馏水充分溶解备用, 可分装冻存, 禁止反复冻融。

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

四、果糖-6-磷酸激酶 (PFK) 酶活测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

1、样本制备:

① 组织样本: 称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆。12000rpm, 4°C离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照组织质量 (g): 提取液体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例进行提取。

② 细菌/细胞样本: 先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 取 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液; 冰浴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); 12000rpm, 4°C离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照细菌/细胞数量 (10^4 个): 提取液 (mL) 为 1:1000~5000 比例进行提取。

③ 血清样本: 直接检测。

2、上机检测:

① 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 340nm。

② 所有试剂可放在 37°C 水浴 5-15min。

③ 试剂一和二和三和四和五可按照 100:40:20:10:10 比例配成混合液 (一枪加 180μL 该混合液) (该混合液用多少配多少, 现配现用)。

④ 依次在 96 孔板中加入:

试剂名称 (μL)	测定管
试剂一	100
试剂二	40
试剂三	20
试剂四	10
试剂五	10
混匀, 37°C下, 孵育 5min 后。	
样本	20
混匀, 37°C下, 10s 时于 340nm 处读取吸光值 A1, 5min 后读取吸光值 A2, $\Delta A = A1 - A2$ 。	

- 【注】1.若 ΔA 小于 0.01 附近, 可以适当延长反应时间 T (如增至 20min 或更长读取 A2); 或适当加大样本加样量 V1 (如增至 50μL, 则试剂一相应减少); 或增加样本取样质量 W; 则改变后的 T 和 V1 和 W 需代入计算公式重新计算。
- 2.若起始值 A1 太大如超过 2 (如颜色较深的植物叶片, 一般色素较高, 则起始值相对会偏高), 可以适当减少样本加样 V1 (如由 20μL 减至 10μL, 则补充 10μL 蒸馏水或试剂一), 则改变后的 V1 需代入计算公式重新计算。或向待测样本中加少许活性炭混匀静置 5min 后 12000rpm, 4°C 离心 10min, 上清液用于检测。
- 3.若 A1 值低于 0.6 或 A2 值在 0.25 附近或 ΔA 大于 0.6, 可减少样本加样体积 V1 (如减至 10μL, 则补充 10μL 蒸馏水或试剂一) 或减少反应时间 T (如减至 2min 后读取 A2), 则改变后的 V1 和 T 代入计算公式重新计算。
- 4.若下降趋势不稳定, 可以每隔 10S 读取一次吸光值, 选取一段线性下降的时间段来参与计算, 相对应的 A 值也代入计算公式重新计算。

五、结果计算:

1、按样本蛋白浓度计算:

酶活定义: 每毫克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。

$$PFK(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (Cpr \times V1 \div V) \div T = 643.1 \times \Delta A \div Cpr$$

2、按样本鲜重计算:

酶活定义: 每克组织每分钟催化 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。

$$PFK(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (Cpr \times V1 \div V) \div T = 643.1 \times \Delta A \div W$$

3、按细菌/细胞密度计算:

酶活定义: 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。

$$PFK(\text{nmol}/\text{min} / 10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 1.29 \times \Delta A$$

4、血清 PFK 活力计算:

酶活定义: 每毫升血清每分钟催化 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。

$$PFK(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div V1 \div T = 643.1 \times \Delta A$$

ϵ ---NADH 摩尔消光系数, $6.22 \times 10^3 \text{ L} / \text{mol} / \text{cm}$; d---96 孔板光径, 0.5cm;

V---加入提取液体积, 1 mL;

V1---加入样本体积, 0.02 mL;

V2---反应体系总体积, $2 \times 10^{-4} \text{ L}$;

T---反应时间, 5 min;

500---细菌或细胞总数, 万;

W---样本质量, g;

Cpr---样本蛋白质浓度, mg/mL; 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。