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℃保存	
试剂一	液体 6mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	液体 2.2mL×1 支	-20℃保存	该试剂可分装后于-20℃保存（尽量避免反复冻融）。
试剂三	粉剂 mg×2 支	-20℃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℃保存，禁止反复冻融，三天内用完。
试剂四	粉剂 mg×1 支	-20℃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℃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℃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℃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℃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℃下，孵育 5min 后。	
样本	20
混匀，37℃下，10s 时于 340nm 处读取吸光值 A1，5min 后读取吸光值 A2，△A=A1-A2。	

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 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÷(ε×d)×V2×10^9]÷(Cpr×V1÷V)÷T=643.1×ΔA÷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 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/g 鲜重)=[ΔA÷(ε×d)×V2×10^9]÷(Cpr×V1÷V)÷T=643.1×ΔA÷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 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 /10^4 cell)=[ΔA÷(ε×d)×V2×10^9]÷(500×V1÷V)÷T=1.29×ΔA

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 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÷(ε×d)×V2×10^9]÷V1÷T=643.1×ΔA

ε---NADH 摩尔消光系数，6.22×10^3 L / mol /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，2×10^{-4} 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。