

磷酸果糖激酶(PFK)活性检测试剂盒说明书

Phosphofructokinase Assay Kit

微量法

货号: AK095

规格: 100T/96S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
提取液 ES07	100mL×1 瓶	4℃保存;
AK095-A	20ml×1 瓶	4℃保存;
AK095-B	粉剂×1 瓶	-20℃保存;
工作液: AK095-B+17ml AK095-A+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;		
AK095-C	粉剂×1 支	4℃保存;
配制方法: 加 1ml 蒸馏水充分混匀, 冰上放置备用; 现配现用;		
AK095-D	液体×1 支	4℃保存;
配制方法: 加 1ml 蒸馏水充分混匀, 冰上放置备用; 现配现用;		

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介:

意义: 磷酸果糖激酶 (Phosphofructokinase, 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。

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。

自备用品:

紫外分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔板、水浴锅、可调式移液枪、研钵、冰和双蒸水。

粗酶液提取:

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 (10⁴ 个): 提取液 ES07 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液 ES07, 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); 然后 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. 试剂准备见产品组成及保存条件列表。
3. 样本测定, 依次在微量石英比色皿或 96 孔板中加入下列试剂:

试剂名称	测定管 (ul)
样本	10
AK095-C	10
AK095-D	10

AK095-B	170
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： 比色后迅速将比色皿或 96 孔板连同反应液一起放入 37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）水浴或恒温箱中，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：

- 比色皿中反应液的温度必须保持 37℃或 25℃，取小烧杯一只装入一定量的 37℃或 25℃ 蒸馏水，将此烧杯放入 37℃或 25℃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预热。
- 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 ES07 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。
- 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。

PFK 酶活性计算：

a. 使用微量石英比色皿测定的计算公式如下

- 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。

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

- 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。

计算公式：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。

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

(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。

计算公式：PFK (nmol/min /10⁴ cell) = $[\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.642 \times \Delta A$

注： V_{反总}：反应体系总体积，2×10⁻⁴ L；ε：NADH 摩尔消光系数，6.22×10³ 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，1 mL；T：反应时间，10 min；C_{pr}：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 孔板测定的计算公式如下

- 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。

计算公式：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 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。

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

(1) 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 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。

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

(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 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。

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

注: $V_{\text{反总}}$: 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 孔板光径, 0.5cm; $V_{\text{样}}$: 加入样本体积, 0.01 mL; $V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积, 1 mL; T : 反应时间, 10 min; C_{pr} : 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。