

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

(分光法 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 18mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂二	粉剂 mg×1 瓶	4℃ 保存	使用前甩几下使试剂落入底部, 再加 8.2mL 的蒸馏水溶解
试剂三	粉剂 mg×4 支	-20℃ 保存	使用前甩几下使试剂落入底部, 每支加 1.1mL 的蒸馏水溶解, 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	使用前甩几下使试剂落入底部, 再加 4.2mL 的蒸馏水溶解备用。
试剂五	粉剂 mg×1 支	-20℃ 保存	使用前甩几下使试剂落入底部, 再加 4.2mL 的蒸馏水溶解备用。

三、所需的仪器和用品:

紫外分光光度计、1mL 石英比色皿 (光径 1cm)、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 (10⁴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 紫外分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 340nm, 蒸馏水调零。

② 所有试剂解冻至室温 (25℃)。

③ 依次在 1mL 石英比色皿中加入:

试剂名称 (μL)	测定管
试剂一	320
试剂二	160
试剂三	80
试剂四	80
试剂五	80
混匀, 37°C下, 孵育 5min 后。	
样本	80
混匀, 10s 时于 340nm 处读取吸光值 A1, 5min 后读取吸光值 A2, ΔA=A1-A2。	

- 【注】1. 若ΔA 的值在零附近, 可以适当延长反应时间到 20min 或更长读取 A2, 改变后的反应时间需代入计算公式重新计算。或适当加大样本量, 则改变后的加样体积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量, 则改变后的加样体积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ΔA 大于 0.6, 可减少反应时间 (如 2min), 则改变后的反应时间 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 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。

$$\text{PFK (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times 10^9] \div (\text{Cpr} \times V_1 \div V) \div T = 321.6 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

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。

$$\text{PFK (nmol/min /g 鲜重)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times 10^9] \div (\text{Cpr} \times V_1 \div V) \div T = 321.6 \times \Delta A \div W$$

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 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。

$$\text{PFK (nmol/min /10}^4\text{cell)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times 10^9] \div (500 \times V_1 \div V) \div T = 0.643 \times \Delta A$$

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 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。

$$\text{PFK (nmol/min/mL)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times 10^9] \div V_1 \div T = 321.6 \times \Delta A$$

ε: NADH 摩尔消光系数, 6.22×10³ L / mol / cm; d: 光径, 1cm;

V: 加入提取液体积, 1 mL;

V1: 加入样本体积, 0.08 mL;

V2: 反应体系总体积, 8×10⁻⁴L;

T: 反应时间, 5min;

500: 细菌或细胞总数, 500 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。