

## 磷酸果糖激酶（PFK）活性检测试剂盒（微量法）

产品货号：BA1195

产品规格：100管/96样

### 产品简介：

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<sup>+</sup>，在340nm下测定NADH下降速率，即可反映PFK活性。

**注意：实验之前建议选择2-3个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。**

### 产品内容：

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体100mL×1瓶	2-8℃
试剂一	液体20mL×1瓶	2-8℃
试剂二	粉剂×1瓶	-20℃
试剂三	液体25μL×1瓶	-20℃
试剂四	液体10μL×1瓶	2-8℃

### 溶液的配制：

1. 试剂二：临用前加入17mL试剂一和1.13mL蒸馏水充分溶解，置于37℃（哺乳动物）或25℃（其他物种）水浴5分钟，用不完的试剂-20℃分装保存一周；
2. 试剂三：液体置于试剂瓶内EP管中。临用前根据用量按照试剂三:蒸馏水为1:50的体积比例充分混匀，现用现配；用不完的试剂三原液建议-20℃分装保存，避免反复冻融；
3. 试剂四：液体置于试剂瓶内EP管中。临用前根据用量按照试剂四:蒸馏水为 1:125 的体积比例充分混匀，现用现配。

### 需自备的仪器和用品：

紫外分光光度计/酶标仪、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、微量石英比色皿/96孔板（UV）、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水。

### 操作步骤：

#### 一、样本的前处理

##### 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（10<sup>4</sup>个）提取液体积（mL）为500-1000:1的比例（建议500万细菌或细胞加入1mL提取液），超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率20%或者200W，超声3s，间隔10s，重复30次）；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。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司  
Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱：saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

3. 血清（浆）样品：直接检测。

## 二、测定步骤

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

2. 样本测定

在微量石英比色皿或96孔UV板中加入10 $\mu$ L样本、10 $\mu$ L试剂三、10 $\mu$ L试剂四和170 $\mu$ L试剂二，混匀，立即记录340nm处20s时的吸光值A1，比色后迅速将比色皿或96孔板连同反应液一起放入37 $^{\circ}$ C（哺乳动物）或25 $^{\circ}$ C（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，340nm下比色，记录10分20秒时的吸光度A2，计算 $\Delta A=A1-A2$ 。

## 三、PFK 活力单位的计算：

### a.用微量石英比色皿测定的计算公式如下：

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。

$$\text{PFK (U/mL)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 321 \times \Delta A$$

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。

$$\text{PFK (U/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) \div T = 321 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(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。

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

(3) 按细菌或细胞密度计算

单位的定义：每1万个细菌或细胞在反应体系中每分钟催化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。

$$\text{PFK (U/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.642 \times \Delta A$$

V反总：反应体系总体积，2 $\times 10^{-4}$ L； $\epsilon$ ：NADH 摩尔消光系数，6.22 $\times 10^3$ L/mol/cm；d：比色皿光径，1 cm；V样：加入样本体积，0.01mL；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。

### b.用96孔板测定的计算公式如下：

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。

$$\text{PFK (U/mL)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 535 \times \Delta A$$

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。

$$\text{PFK (U/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) \div T = 535 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(2) 按样本质量计算

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1nmolATP转化为1nmol果糖-1,6-二磷酸和



扫一扫 加微信

**上海尚宝生物科技有限公司**  
Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱：saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

1nmol ADP定义为一个酶活力单位。

$$\text{PFK (U/g 质量)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 535 \times \Delta A \div W$$

(3) 按细菌或细胞数量计算

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。

$$\text{PFK (U/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1.07 \times \Delta A$$

V反总：反应体系总体积， $2 \times 10^{-4}$ L； $\epsilon$ ：NADH摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3$ L/mol/cm；d：96孔板光径，0.6cm；V样：加入样本体积，0.01mL；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， $1\text{mol} = 10^9\text{nmol}$ 。

#### 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℃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。
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. 不同匀浆组织中PFK活力不一样，做正式试验之前请坐1-2个预实验，若 $\Delta A > 0.5$ ，则说明活力太高，必须用提取液稀释成适当浓度匀浆上清液（计算式中乘以相应稀释倍数），或缩短反应时间至2min或5min，使 $\Delta A < 0.5$ ，以提高检测的灵敏度。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司  
Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q：807961520

邮箱：saintbio@126.com

<http://www.saint-bio.com>