

6-Phosphofructokinase Activity Assay Kit

果糖-6-磷酸激酶 (PFK) 试剂盒说明书

货号: BN72345 | 方法: 微板法 | 规格: 96 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 120mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	液体 12mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	液体 4.5mL×1 瓶	-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×4 支	-20°C保存	每支使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×2 支	-20°C保存	临用前甩几下使粉剂落入底部, 每支再加 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×2 支	-20°C保存	临用前甩几下使粉剂落入底部, 每支再加 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 (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 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， $\Delta A = A1 - A2$ 。	

注意：本操作流程适用于绝大多数常规样本检测，实验条件可根据实际样本状态适度微调；
针对特殊类型样本，我司技术支持可提供专属优化建议。

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。

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

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 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。

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

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 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。

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

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 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。

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

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， 2×10^{-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。