

6-Phosphofructokinase Activity Assay Kit

果糖-6-磷酸激酶（PFK）试剂盒说明书

货号: BN72346 | 方法: 紫外分光法 | 规格: 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 24mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	液体 8.5mL×1 瓶	-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×4 支	-20℃保存	用前甩几下使试剂落入底部，每支加 0.6mL 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×2 支	-20℃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℃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:

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 所有试剂可放在 37°C 水浴 5-15min。
- ③ 试剂一和二和三和四和五可按照 400:150:40:20:20 比例配成混合液（一枪加 630μL 该混合液）（该混合液用多少配多少，现配现用）。
- ④ 依次在 1mL 石英比色皿（光径 1cm）中加入：

试剂名称（μL）	测定管
试剂一	400
试剂二	150
试剂三	40
试剂四	20
试剂五	20
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， $\Delta A = A1 - A2$ 。	

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 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。

$$PFK(\text{nmol/min/mg prot}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (Cpr \times V1 \div V) \div T = 285.4 \times \Delta A \div Cpr$$

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 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。

$$PFK(\text{nmol/min/g 鲜重}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (Cpr \times V1 \div V) \div T = 285.4 \times \Delta A \div W$$

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 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。

$$PFK(\text{nmol/min}/10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.571 \times \Delta A$$

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 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。

$$PFK(\text{nmol/min/mL}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div V1 \div T = 285.4 \times \Delta A$$

ϵ ---NADH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$ ； 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， $7.1 \times 10^{-4} \text{ L}$ ；

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。