

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

分光光度法 50 管/48 样

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

### 测定意义：

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。

### 测定原理：

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

产品名称	GC007-50T/48S	Storage
提取液：液体	60ml	4°C
试剂一：液体	40ml	4°C
试剂二：粉剂	1 瓶	-20°C
试剂三：粉剂	1 支	4°C
试剂四：液体	16μl	4°C
说明书	一份	

试剂二：粉剂×1 瓶，-20°C 保存，临用前加入 2.8ml 蒸馏水充分溶解备用；用不完的试剂分装后-20 度保存，禁止反复冻融；

试剂三：粉剂×1 支，4°C 保存，临用前加入 260μl 蒸馏水充分溶解备用；用不完的试剂分装后-20 度保存，禁止反复冻融；

试剂四：液体 16μl×1 支，4°C 保存，临用前加入 260μl 蒸馏水充分溶解备用；用不完的试剂分装后-20 度保存，禁止反复冻融；

### 自备仪器和用品：

紫外分光光度计、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、1 ml 石英比色皿、研钵、冰和蒸馏水。

### 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 1000~5000: 1 的比例（建议 2000 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 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；8000g 4°C 离心 10min，取上清，置冰上待测。

最终解释权所有 © 伊势久（江苏连云港）生物科技有限责任公司，保留一切权利



- 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°C离心 10min, 取上清, 置冰上待测。
- 3、血清 (浆) 样品：直接检测。

### 测定步骤和加样表:

- 1、分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 340nm, 蒸馏水调零。
- 2、工作液 (可测 25 个样) 的配制: 取 19ml 试剂一和 1.26ml 试剂二充分混匀; 用不完的试剂分装后-20 度保存, 禁止反复冻融;
- 3、将工作液置于 37°C(哺乳动物)或 25°C(其它物种)预热 10 分钟。
- 4、加样表:

试剂名称 (μl)	测定管
工作液	800
样本	30
试剂三	5
试剂四	5

将上述试剂按顺序加入 1 ml 石英比色皿中, 立即混匀, 加试剂四的同时开始计时, 记录在 340 nm 波长下 20 秒时的初始吸光度 A1 和 10 分 20 秒时的吸光度 A2, 计算 $\Delta A=A1-A2$ 。

**注意:** 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。

### PFK 活力单位的计算:

- 1、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 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。

$$\text{PFK (nmol/min/ml)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 450 \times \Delta A$$

- 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。

$$\text{PFK (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 450 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

- (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 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。

$$\text{PFK (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 450 \times \Delta A \div W$$

- (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。

$$\text{PFK (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (2000 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.225 \times \Delta A$$



V 反总: 反应体系总体积,  $8.4 \times 10^{-4}$  L;  $\epsilon$ : NADH 摩尔消光系数,  $6.22 \times 10^3$  L / mol / cm; d: 比色皿光径, 1cm; V 样: 加入样本体积, 0.03 ml; V 样总: 加入提取液体积, 1 ml; T: 反应时间, 10 min; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/ml; W: 样本质量, g; 2000: 细菌或细胞总数, 2000 万。

