

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

微量法 100 管/96 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	GC008-100T/96S	Storage
提取液: 液体	100ml	4°C
试剂一: 液体	20ml	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	8μl	4°C
说明书	一份	

### 自备仪器和用品:

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、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。
- 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。

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



## 测定步骤:

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

### 2、样本测定

(1) 在试剂二瓶中加入 17ml 试剂一和 1.13ml 蒸馏水充分溶解, 置于 37°C (哺乳动物) 或 25°C (其它物种) 水浴 5min; 用不完的试剂分装后-20°C 保存, 禁止反复冻融;

(2) 在试剂三中加入 1ml 蒸馏水充分混匀, 冰上放置备用; 用不完的试剂分装后-20°C 保存, 禁止反复冻融;

(3) 在试剂四中加入 1ml 蒸馏水充分混匀, 冰上放置待用; 用不完的试剂分装后-20°C 保存, 禁止反复冻融;

(4) 在微量石英比色皿或 96 孔板中加入 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 和 10min20s 后的吸光值 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:

### 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) 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。

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

#### 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 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。

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

##### (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 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。

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

##### (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。

$$\text{PFK (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (2000 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.1605 \times \Delta A$$

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, 1cm; V 样: 加入样本体积, 0.01 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。

### 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）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。

$$\text{PFK (nmol/min/ml)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 642 \times \Delta A$$

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。

$$\text{PFK (nmol/min /mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 642 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

(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。

$$\text{PFK (nmol/min /g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 642 \times \Delta A \div W$$

(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。

$$\text{PFK (nmol/min /}10^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (2000 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.321 \times \Delta A$$

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，0.5cm;

V 样：加入样本体积，0.01 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。

