



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

磷酸果糖激酶(PFK)活性检测试剂盒(紫外分光光度法)

货号: R41808

规格: 50T/48S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
提取液ES07	60ml×1瓶	4℃保存;
R41808-A	45ml×1瓶	4℃保存;
R41808-B	粉剂×1瓶	-20℃保存; 临用前加入2.8mL双蒸水充分溶解 备用, -20℃分装保存, 避免反复冻融;
R41808-C	粉剂×1支	-20℃保存; 临用前加入3ml蒸馏水充分溶解备用, -20℃分装保存, 避免反复冻融;
R41808-D	粉剂×1支	-20℃保存; 临用前加入3ml蒸馏水充分溶解备用, -20℃分装保存, 避免反复冻融;
PFK工作液(可测25个样)的配制: 取20mL R41808-A和1.32mLR41808-B 充分混匀, 现用现配。		

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

简介

意义: 磷酸果糖激酶 (Phosphofructokinase, 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。

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

自备用品:

紫外分光光度计、1ml 石英比色皿、水浴锅、可调式移液枪、研钵、冰和双蒸水。



粗酶液提取:

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 (10^4 个): 提取液 ES07 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液 ES07, 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); 然后 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 ES07 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。

3. 血清 (浆) 样品: 直接检测。

测定步骤:

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. 试剂准备见产品组成及保存条件列表。
3. 样本测定, 依次在 1 mL 石英比色皿中加入下列试剂:

试剂名称	测定管 (ul)
PFK 工作液	850
样本	50
R41808-C	50
R41808-D	50

将上述试剂按顺序加入 1 mL 石英比色皿中, 加 R41808-D 的同时开始计时; 在 340 nm 波长下记录 20 秒时的初始吸光度 A1, 比色后迅速将比色皿连同反应液一起放入 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其它物种) 水浴中, 准确反应 10 分钟; 迅速取出比色皿并擦干, 340 nm 下比色, 记录 10 分 20 秒时的吸光度 A2, 计算 $\Delta A = A1 - A2$ 。

PFK 酶活性计算:

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 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。



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

2. 组织、细菌或细胞中 PFK 活力计算:

(1) 按样本蛋白浓度计算:

单位的定义: 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 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。

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

(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 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。

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

(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 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。

计算公式: $\text{PFK (U/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.64 \times \Delta A$

注: $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, 10^{-3}L ; ϵ : NADH 摩尔消光系数, $6.22 \times 10^3 \text{L/mol/cm}$; d : 比色皿光径, 1 cm; $V_{\text{样}}$: 加入样本体积, 0.05mL; $V_{\text{样总}}$: 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. 比色皿中反应液的温度必须保持 37°C 或 25°C , 取小烧杯一只装入一定量的 37°C 或 25°C 蒸馏水,



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

将此烧杯放入 37°C 或 25°C 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预热。

2. 测定过程中 R41808-C、R41808-D 和样本在冰上放置，以免变性和酶失活。

3. 不同匀浆组织中 PFK 活力不一样，做正式试验之前请做 1-2 次预试验，若 $\Delta A > 0.5$ ，则说明活力太高，必须用提取液 ES07 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。

4. 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。



源叶