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(微量法)

货号： R41809

规格： 100T/96S

产品组成及保存条件：

编号	规格	储存条件
提取液ES07	100mL×1瓶	4℃保存；
R41809-A	20ml×1瓶	4℃保存；
R41809-B	粉剂×1瓶	-20℃保存；
工作液：R41809-B+17ml R41809-A+1.13ml蒸馏水充分溶解，置于37℃(哺乳动物)或25℃(其它物种)水浴5min;现配现用；		
R41809-C	粉剂×1支	4℃保存；
配制方法：加1ml蒸馏水充分混匀，冰上放置备用；现配现用；		
R41809-D	液体×1支	4℃保存；
配制方法：加1ml蒸馏水充分混匀，冰上放置备用；现配现用；		

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/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔板、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 8000g4℃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℃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. 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. 试剂准备见产品组成及保存条件列表。

3. 样本测定，依次在微量石英比色皿或 96 孔板中加入下列试剂：

试剂名称	测定管(ul)
样本	10
R41809-C	10
R41809-D	10
R41809-B	170
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△A=A1-A2。注 意：比色后迅速将比色皿或96孔板连同反应液一起放入37℃(哺乳动物)或25℃(其它物种)水浴或恒温箱中，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△A=A1-A2。	

注意事项：

1. 比色皿中反应液的温度必须保持 37℃或 25℃，取小烧杯一只装入一定量的 37℃或 25℃ 蒸馏水，将此烧杯放入 37℃或 25℃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. 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 ΔA>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 ΔA<0.5，以提高检测灵敏度。

3. 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

PFK 酶活性计算：

a. 使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。

计算公式：PFK (nmol/min/mL) = [ΔA×V 反总÷(ε×d)×10^9]÷V 样÷T = 321×ΔA

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。

计算公式：PFK (nmol/min/mg prot) = [ΔA×V 反总÷(ε×d)×10^9]÷(V 样×Cpr) ÷T = 321×ΔA÷Cpr

（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。

计算公式：PFK (nmol/min /g 鲜重) = [ΔA×V 反总÷(ε×d)×10^9]÷(W ×V 样÷V 样总)÷T = 321×ΔA÷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。

计算公式：PFK (nmol/min /10^4 cell) = [ΔA×V 反总÷(ε×d)×10^9]÷(500×V 样÷V 样总)÷T = 0.642×ΔA

注： V 反总：反应体系总体积，2×10^{-4} L；ε：NADH 摩尔消光系数，6.22×10^{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)；500：细菌或细胞总数，500 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。

计算公式：PFK (nmol/min/mL) = [ΔA×V 反总÷(ε×d)×10^{9}]÷V 样÷T = 642×ΔA

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。

计算公式：PFK (nmol/min /mg prot) = [ΔA×V 反总÷(ε×d)×10^{9}]÷(V 样×Cpr) ÷T = 642×ΔA÷Cpr

（1）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。

计算公式：PFK (nmol/min /g 鲜重) = [ΔA×V 反总÷(ε×d)×10^{9}]÷(W× V 样÷V 样总)÷T = 642×ΔA÷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。

计算公式：PFK (nmol/min /10^{4} cell) = [ΔA×V 反总÷(ε×d)×10^{9}]÷(500×V 样÷V 样总)÷T = 1.284×ΔA

注： V 反总：反应体系总体积，2×10^{-4} L；ε：NADH 摩尔消光系数，6.22×10^{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)；500：细菌或细胞 总数，500 万。