

## 磷酸果糖激酶（PFK）活性检测试剂盒（紫外分光光度法）

产品货号：BA1194

产品规格：50管/48样

### 产品简介：

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。

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。

**注意：**实验之前建议选择2-3个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

### 产品内容：

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体60 mL×1瓶	2-8℃
试剂一	液体40 mL×1瓶	2-8℃
试剂二	粉剂×1瓶	-20℃
试剂三	液体45μL×1瓶	-20℃
试剂四	液体20μL×1瓶	2-8℃

### 溶液的配制：

1. 试剂二：临用前加入2.8mL双蒸水充分溶解备用；-20℃分装保存一周；
2. 试剂三：液体置于试剂瓶内EP管中。临用前根据用量按照试剂三:蒸馏水为2:13 的体积比例充分混匀，现用现配；用不完的试剂三原液建议-20℃分装保存，避免反复冻融；
3. 试剂四：液体置于试剂瓶内EP管中。临用前根据用量按照试剂四:蒸馏水为4:65的体积比例充分混匀，现用现配； PFK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，现用现配。

### 需自备的仪器和用品：

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

### 操作步骤：

#### 一、样本的前处理

##### 1. 细菌、细胞或组织样品的制备

细菌或细胞处理：收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；按照每500万细菌或细胞加入1mL提取液，超声波破碎细菌或细胞（功率20%，超声3s，间隔10s，重复30次）；8000g 4℃离心10min，取上清，置冰上待测。

组织处理：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。

##### 2. 血清（浆）样品：直接检测。

#### 二、测定步骤

1. 分光光度计预热30min以上，调节波长至340nm，蒸馏水调零。
2. 操作表



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com

试剂名称 (μL)	测定管
PFK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1mL石英比色皿中，加样本的同时开始计时；在340nm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，340nm下比色，记录10分20秒时的吸光度A2，计算 $\Delta A = A_1 - A_2$ 。

### 三、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）在反应体系中每分钟催化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。

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

#### 2. 组织、细菌或细胞中PFK活力的计算：

##### (1) 按样本蛋白浓度计算：

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。

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

##### (2) 按样本鲜重计算

单位的定义：每g组织在反应体系中每分钟催化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。

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

##### (3) 按细菌或细胞密度计算

单位的定义：每1万个细菌或细胞在反应体系中每分钟催化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。

$$\text{PFK (U/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.9 \times \Delta A$$

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，0.03mL；V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：

- 测定过程中试剂三、试剂四和样本在冰上放置，以免变性和失活。
- 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。
- 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。
- 若 $\Delta A$ 大于0.5，需将酶液用酶提取液稀释，使 $\Delta A$ 小于0.5，可提高检测灵敏度。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com