

Phosphofructokinase (PFK) Activity Assay Kit

磷酸果糖激酶(PFK)/果糖-6-磷酸激酶活性检测试剂盒 微板法

产品编号	产品名称	规格
BL1819B	磷酸果糖激酶(PFK)/果糖-6-磷酸激酶活性检测试剂盒 微板法	96T

产品简介:

果糖-6-磷酸激酶 (PFK, EC 2.7.1.11) 广泛存在于动物、植物、微生物和培养细胞中, 是糖酵解过程的关键酶之一。

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

产品组成:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	120mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	12mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	粉末×1 瓶	-20°C保存	用前甩几下使试剂落入底部, 再加 4.2mL 的蒸馏水溶解。
试剂三	粉末×4 支	-20°C保存	用前甩几下使试剂落入底部, 每支加 0.55mL 的蒸馏水溶解, 用不完的试剂分装后-20°C保存, 禁止反复冻融, 三天内用完。
试剂四	粉末×2 支	-20°C保存	临用前甩几下使粉剂落入底部, 每支再加 0.6mL 蒸馏水充分溶解备用, 可分装冻存, 禁止反复冻融。
试剂五	粉末×2 支	-20°C保存	临用前甩几下使粉剂落入底部, 每支再加 0.6mL 蒸馏水充分溶解备用, 可分装冻存, 禁止反复冻融。

使用方法:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

一、样本准备

1. 组织样本:

(a) 称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆;

(b) 12000rpm, 4°C离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照组织质量 (g): 提取液体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例进行提取。

2. 细胞/细菌样本:

(a) 先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清;

(b) 取 5×10^6 个细菌或细胞加入 1mL 提取液, 超声波破碎细菌或细胞 (冰浴, 功率 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次);

(c) 12000rpm 4°C离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 按照每 $0.5 \sim 1 \times 10^7$ 个细菌/细胞加入 1mL 提取液进行提取。

3. 液体样本:

Note: For in vitro research use only, not for diagnostic or therapeutic use, This product is not a medical device.

注意: 在体外研究使用, 不用于诊断或治疗用途, 本产品不是医疗装置。



直接检测；若浑浊，离心后取上清检测。

二、样品测定

1. 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 340nm。
2. 所有试剂可放在 37°C 水浴 5-15min。
3. 试剂一和二和三和四和五可按照 100:40:20:10:10 比例配成混合液（一枪加 180μL 该混合液）（该混合液用多少配多少，现配现用）。
4. 依次在 96 孔板中加入：

试剂名称（μL）	测定管
试剂一	100
试剂二	40
试剂三	20
试剂四	10
试剂五	10
混匀，37°C 下，孵育 5min 后。	
样本	20
混匀，10s 时于 340nm 处读取吸光值 A1， 5min 后读取吸光值 A2， $\Delta A = A1 - A2$ 。	

- 【注】1. 若 ΔA 小于 0.01 附近，可以适当延长反应时间 T（如增至 20min 或更长读取 A2）；或适当加大样本加样量 V1（如增至 50μL，则试剂一相应减少）；或增加样本取样质量 W；则改变后的 T 和 V1 和 W 需代入计算公式重新计算。
2. 若起始值 A1 太大如超过 2（如颜色较深的植物叶片，一般色素较高，则起始值相对会偏高），可以适当减少样本加样 V1（如由 20μL 减至 10μL，则补充 10μL 蒸馏水或试剂一），则改变后的 V1 需代入计算公式重新计算。或向待测样本中加少许活性炭混匀静置 5min 后 12000rpm，4°C 离心 10min，上清液用于检测。
3. 若 A1 值低于 0.6 或 A2 值在 0.25 附近或 ΔA 大于 0.6，可减少样本加样体积 V1（如减至 10μL，则补充 10μL 蒸馏水或试剂一）或减少反应时间 T（如减至 2min 后读取 A2），则改变后的 V1 和 T 代入计算公式重新计算。
4. 若下降趋势不稳定，可以每隔 10S 读取一次吸光值，选取一段线性下降的时间段来参与计算，相对应的 A 值也代入计算公式重新计算。

三、结果计算

1. 按样本蛋白浓度计算：

酶活定义：每毫克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。

$$PFK(\text{nmol/min/mg prot}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (Cpr \times V1 \div V) \div T = 643.1 \times \Delta A \div Cpr$$

2. 按样本鲜重计算：

酶活定义：每克组织每分钟催化 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。

$$PFK(\text{nmol/min/g 鲜重}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (Cpr \times V1 \div V) \div T = 643.1 \times \Delta A \div W$$

3. 按细菌/细胞密度计算：

酶活定义：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。

$$PFK(\text{nmol/min} / 10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 1.29 \times \Delta A$$

4. 血清 PFK 活力计算：

酶活定义：每毫升血清每分钟催化 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。

$$PFK(\text{nmol/min/mL}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div V1 \div T = 643.1 \times \Delta A$$



ϵ ---NADPH 摩尔消光系数, $6.22 \times 10^3 \text{ L / mol / cm}$ d ---96 孔板光径, 0.5cm
 V ---加入提取液体积, 1 mL V_1 ---加入样本体积, 0.02mL
 V_2 ---反应体系总体积, $2 \times 10^{-4} \text{ L}$ T ---反应时间, 5min
500---细菌或细胞总数, 万 W ---样本质量, g
 C_{pr} ---样本蛋白质浓度, mg/mL

注意事项:

1. 本产品仅限于专业人员的科学研究用, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品或药品。
2. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

有效期:

-20°C保存六个月。

