

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 分光法

产品编号	产品名称	规格
BL1819A	磷酸果糖激酶(PFK)/果糖-6-磷酸激酶活性检测试剂盒 分光法	48T

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	60mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	24mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	粉末×1 瓶	-20°C保存	使用前甩几下使试剂落入底部, 再加 8.4mL 的蒸馏水溶解。
试剂三	粉末×4 支	-20°C保存	使用前甩几下使试剂落入底部, 每支加 0.6mL 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:

- 称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆;
- 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:

- 先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清;
- 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);
- 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. 紫外分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 340nm，蒸馏水调零。
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 400:150:40:20:20 比例配成混合液（一枪加 630μL 该混合液）（该混合液用多少配多少，现配现用）。
4. 在 1mL 石英比色皿（光径 1cm）中依次加入：

试剂名称（μL）	测定管
试剂一	400
试剂二	150
试剂三	40
试剂四	20
试剂五	20
混匀，37°C 下，孵育 5min 后。	
样本	80
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 150μL，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 A1 太大如超过 2（如颜色较深的植物叶片，一般色素较高，则起始值会偏高）可减少样本加样体积 V1（如减至 40μL，则补充 40μL 蒸馏水或试剂一），则改变后 V1 需代入公式重新计算。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 ΔA 大于 0.6，可减少样本加样体积 V1（如减至 40μL，则补充 40μL 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。

$$PFK(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (Cpr \times V1 \div V) \div T = 285.4 \times \Delta A \div Cpr$$

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。

$$PFK(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (Cpr \times V1 \div V) \div T = 285.4 \times \Delta A \div W$$

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。

$$PFK(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.571 \times \Delta A$$

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。

$$PFK(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div V1 \div T = 285.4 \times \Delta A$$

ϵ ---NADPH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3 \text{ L} / \text{mol} / \text{cm}$ d ---1mL 石英比色皿，1cm

V ---加入提取液体积，1 mL

$V1$ ---加入样本体积，0.08mL

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。





V2---反应体系总体积, 7.1×10^{-4} L
500---细菌或细胞总数, 500 万
Cpr---样本蛋白质浓度, mg/mL

T---反应时间, 5min
W---样本质量, g

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。

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。

电话: 400-600-4213

邮箱: techserv@labgic.com

