

果糖-6-磷酸激酶（6-phosphofructokinase, PFK）试剂盒说明书

微量法 100 管/96 样

注 意：正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义：

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。

测定原理：

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。

需自备的仪器和用品：

紫外分光光度计/酶标仪、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔板、研钵、冰和蒸馏水。

试剂的组成和配制：

提取液：100mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂一：液体 20mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂二：粉剂×1 瓶，-20℃ 保存；

试剂三：粉剂×1 支，4℃ 保存；

试剂四：液体 8 μL×1 支，4℃ 保存；

样本的前处理：

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（10⁴ 个）：提取液体积（mL）为 1000~5000：1 的比例（建议 2000 万细菌或细胞加入 1mL 提取液），超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 20% 或 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；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、样本测定

（1）在试剂二瓶中加入 17mL 试剂一和 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；用不完的试剂分装后-20℃ 保存，禁止反复冻融；

（2）在试剂三中加入 1mL 蒸馏水充分混匀，冰上放置备用；用不完的试剂分装后-20℃ 保存，禁止反复冻融；

（3）在试剂四中加入 1mL 蒸馏水充分混匀，冰上放置待用；用不完的试剂分装后-20℃ 保存，禁止反复冻融

融:

(4) 在微量石英比色皿或 96 孔板中加入 10 μL 样本、10 μL 试剂三、10 μL 试剂四和 170 μL 试剂二, 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 $\Delta A=A1-A2$ 。

注意: 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 $\Delta A>0.5$, 则说明活力太高, 必须用提取液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。

PFK 活力单位的计算

a. 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。

$$\text{PFK (nmol/min/mL)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 321 \times \Delta A$$

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: 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。

$$\text{PFK (nmol/min /mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 321 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(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。

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

(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。

$$\text{PFK (nmol/min /10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (2000 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.1605 \times \Delta A$$

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; 2000: 细菌或细胞总数, 2000 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 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。

$$\text{PFK (nmol/min/mL)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 642 \times \Delta A$$

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: 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。

$$\text{PFK (nmol/min /mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 642 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(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。

PFK (nmol/min /g 鲜重) = $[\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 642 \times \Delta A \div W$

(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 (nmol/min /10⁴ cell) = $[\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (2000 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.321 \times \Delta A$

V 反总：反应体系总体积，2×10⁻⁴ L；ε：NADH 摩尔消光系数，6.22×10³ 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；2000：细菌或细胞总数，2000 万。