

## 磷酸果糖激酶（PFK）活性检测试剂盒说明书

紫外分光光度法

**注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。**

货号：BC0530

规格：50T/48S

**产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。**

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 60 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂一	液体 45 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂二 A	粉剂×1 支	-20°C保存
试剂二 B	粉剂×1 支	-20°C保存
试剂二 C	粉剂×2 支	-20°C保存
试剂二 D	粉剂×1 支	-20°C保存
试剂三	液体 45μL×1 支	2-8°C保存
试剂四	液体 20μL×1 支	2-8°C保存

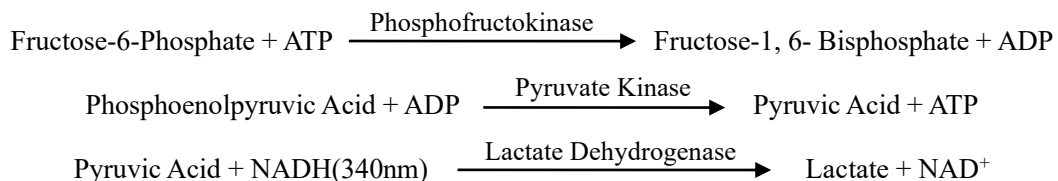
溶液的配制：

- 1、试剂二 A：临用前加入 1mL 蒸馏水，用不完的试剂-20°C分装保存 4 周，避免反复冻融；
- 2、试剂二 B：临用前加入 1mL 蒸馏水，用不完的试剂-20°C分装保存 4 周，避免反复冻融；
- 3、试剂二 C：临用前取一支加入 0.25mL 蒸馏水，用不完的试剂-20°C分装保存 2 周，避免反复冻融；
- 4、试剂二 D：临用前加入 1mL 蒸馏水，用不完的试剂-20°C分装保存 4 周，避免反复冻融；
- 5、试剂三：临用前根据用量按照试剂三:蒸馏水为 2μL:13μL（约 3T）的体积比例充分混匀，现用现配；
- 6、试剂四：临用前根据用量按照试剂四:蒸馏水为 4μL:65μL（约 13T）的体积比例充分混匀，现用现配；
- 7、工作液的配制：根据样本量按试剂一：试剂二 A：试剂二 B：试剂二 C：试剂二 D =22mL：0.5mL：0.5mL：0.25mL：0.5mL（约 29T）的比例配制工作液，现用现配；

### 产品说明：

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。

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。**

### 需自备的仪器和用品：

紫外分光光度计、水浴锅/恒温培养箱、台式离心机、可调式移液器、1mL 石英比色皿、研钵/匀浆器/细胞超声破碎仪、冰和蒸馏水。

### 操作步骤：

#### 一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

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）：提取液体体积（mL）为 500-1000：1 的比例（建议 500 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 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；8000g 4°C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°C离心 10min，取上清，置冰上待测。
3. 血清（浆）等其他液体：直接检测。若有沉淀请离心后取上清待测。

#### 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. PFK 工作液临用前于 37°C预热 10min。
3. 操作表：

试剂名称（ $\mu\text{L}$ ）	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，立即充分混匀后于 340nm 处测定 20s 时的吸光值 A1，迅速置于 37°C准确反应 10min，拿出迅速擦干测定 10min 20s 时的吸光值 A2，记录 340nm 下 20s 时吸光值 A1 和 10min 后的吸光值 A2。计算  $\Delta A = A1 - A2$ 。

#### 三、PFK 活性的计算

##### 1、血清（浆）PFK 活性的计算：

单位的定义：每毫升血清（浆）在反应体系中每分钟催化 1nmol NADH 转化为 1nmol NAD<sup>+</sup> 定义为一个酶活性单位。

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

##### 2、组织、细菌或细胞中 PFK 活性的计算：

###### (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 NADH 转化为 1nmol NAD<sup>+</sup> 定义为一个酶活性单位。

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

###### (2) 按样本质量计算

单位的定义：每 g 组织在反应体系中每分钟催化 1nmol NADH 转化为 1nmol NAD<sup>+</sup> 定义为一个酶活性单位。

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

### (3) 按细菌或细胞数量计算

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 NADH 转化为 1nmol NAD<sup>+</sup> 定义为一个酶活性单位。

$$\text{PFK 活性 (U/10}^4\text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (N \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 450 \times \Delta A \div N$$

V 反总：反应体系总体积，8.4×10<sup>-4</sup>L；ε：NADH 摩尔消光系数，6.22×10<sup>3</sup>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；N：细菌或细胞总数，以万计；10<sup>9</sup>：单位换算系数，1mol=10<sup>9</sup>nmol。

#### 注意事项：

1. 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。
2. 比色皿中反应液的温度必须保持 37°C，取小烧杯一只装入一定量的 37°C 蒸馏水，将此烧杯放入 37°C 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。
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。
4. 若 ΔA 大于 0.5，需将酶液用酶提取液稀释，使 ΔA 小于 0.5，可提高检测灵敏度。注意同步修改计算公式。

#### 实验实例：

- 1、取 0.1g 黑麦草加入 1mL 提取液进行匀浆研磨，取上清之后按照测定步骤操作，测得计算 ΔA = A1 - A2 = 1.375 - 0.995 = 0.380，按样本质量计算酶活得：

$$\text{PFK 活性 (U/g 质量)} = 450 \times \Delta A \div W = 450 \times 0.380 \div 0.1 = 1710 \text{ U/g 质量。}$$

- 2、取 0.1g 桃叶加入 1mL 提取液进行匀浆研磨，取上清之后按照测定步骤操作，测得计算 ΔA = A1 - A2 = 1.38 - 1.323 = 0.057，按样本质量计算酶活得：

$$\text{PFK 活性 (U/g 质量)} = 450 \times \Delta A \div W = 450 \times 0.057 \div 0.1 = 256.5 \text{ U/g 质量。}$$

#### 参考文献：

[1] Papagianni M, Avramidis N. Lactococcus lactis as a cell factory: a twofold increase in phosphofructokinase activity results in a proportional increase in specific rates of glucose uptake and lactate formation[J]. Enzyme and microbial technology, 2011, 49(2): 197-202.

#### 相关系列产品：

- BC2200/BC2205 丙酮酸 (PA) 含量检测试剂盒
- BC2230/BC2235 乳酸 (LA) 含量检测试剂盒
- BC2190/BC2195 磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 (PEPC) 活性检测试剂盒
- BC2250/BC2255 3-磷酸甘油酸激酶 (PGK) 活性检测试剂盒