

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

分光光度法 50 管/48 样

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、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、1 mL 石英比色皿、研钵、冰和蒸馏水。

试剂的组成和配制

提取液: 60mL×1 瓶, 4°C 保存;

试剂一: 液体 40mL×1 瓶, 4°C 保存;

试剂二: 粉剂×1 瓶, -20°C 保存, 临用前加入 2.8mL 蒸馏水充分溶解备用; 用不完的试剂分装后-20 度保存, 禁止反复冻融;

试剂三: 粉剂×1 支, 4°C 保存, 临用前加入 260 μ L 蒸馏水充分溶解备用; 用不完的试剂分装后-20 度保存, 禁止反复冻融;

试剂四: 液体 16 μ L×1 支, 4°C 保存, 临用前加入 260 μ L 蒸馏水充分溶解备用; 用不完的试剂分装后-20 度保存, 禁止反复冻融;

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 (10^4 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°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) 样品: 直接检测。

测定步骤和加样表

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

2、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; 用不完的试剂分装后-20 度保存, 禁止反复冻融;

3、将工作液置于 37°C (哺乳动物) 或 25°C (其它物种) 预热 10 分钟。

4、加样表:

试剂名称 (μ L)	测定管
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 1 mL 石英比色皿中, 立即混匀, 加试剂四的同时开始计时, 记录在

340 nm 波长下 20 秒时的初始吸光度 A1 和 10 分 20 秒时的吸光度 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

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。

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

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。

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

（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。

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

（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。

$$\text{PFK (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (2000 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.225 \times \Delta A$$

V 反总：反应体系总体积， 8.4×10^{-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，0.03 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。