

磷酸果糖激酶（PFK）活性检测试剂盒说明书

微量法

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：AC10161

规格：100T/96S

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，有疑问请及时联系本公司工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 100 mL×1 瓶	4℃保存
试剂一	液体 20 mL×1 瓶	4℃保存
试剂二	粉剂×1 瓶	-20℃保存
试剂三	液体 25μL×1 瓶	-20℃保存
试剂四	液体 10μL×1 瓶	4℃保存

溶液的配制：

- 1、试剂二：临用前加入 17 mL 试剂一和 1.13 mL 蒸馏水充分溶解，置于 37℃（哺乳动物）或 25℃（其他物种）水浴 5 分钟，用不完的试剂-20℃分装保存一周；
- 2、试剂三：液体置于试剂瓶内 EP 管中。临用前根据用量按照试剂三:蒸馏水为 1:50 的体积比例充分混匀，现用现配；用不完的试剂三原液建议-20℃分装保存，避免反复冻融；
- 3、试剂四：液体置于试剂瓶内 EP 管中。临用前根据用量按照试剂四:蒸馏水为 1:125 的体积比例充分混匀，现用现配。

产品说明：

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-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。

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/酶标仪、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、微量石英比色皿或 96 孔板（UV）、研钵/匀浆器、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（10⁴ 个）提取液体积（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 20%或者 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°C离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

3、血清 (浆) 样本: 直接检测。

二、测定步骤

1、紫外分光光度计/酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 340nm, 蒸馏水调零。

2、样本测定:

在微量石英比色皿或 96 孔 UV 板中加入 10 μ L 样本、10 μ L 试剂三、10 μ L 试剂四和 170 μ L 试剂二, 混匀, 立即记录 340nm 处 20s 时的吸光值 A1, 比色后迅速将比色皿或 96 孔板连同反应液一起放入 37°C (哺乳动物) 或 25°C (其它物种) 水浴或恒温箱中, 准确反应 10 分钟; 迅速取出比色皿并擦干, 340 nm 下比色, 记录 10 分 20 秒时的吸光度 A2, 计算 $\Delta A = A1 - A2$ 。

三、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) 在反应体系中每分钟催化 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。

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

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 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。

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

(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 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。

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

(3) 按细菌或细胞密度计算

单位的定义: 每 1 万个细菌或细胞在反应体系中每分钟催化 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。

$$\text{PFK (U/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.642 \times \Delta A$$

V 反总: 反应体系总体积, 2 $\times 10^{-4}$ L; ϵ : NADH 摩尔消光系数, 6.22 $\times 10^3$ L/mol/cm; d: 比色皿光径, 1cm; V 样: 加入样本体积, 0.01mL; V 样总: 加入提取液体积, 1mL; T: 反应时间, 10min; C_{pr}: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量, g; 500: 细菌或细胞总数, 500 万; 10⁹: 单位换算系数, 1mol=10⁹nmol。

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) 在反应体系中每分钟催化 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。

$$\text{PFK (U/mL)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 535 \times \Delta A$$

2、组织、细菌或细胞中 PFK 活力的计算:

(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 果糖-6-磷酸和 1nmolATP 转化为 1nmol 果糖-1,6-二磷酸和 1nmol ADP 定义为一个酶活力单位。

$$\text{PFK (U/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) \div T = 535 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(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 果糖-6-磷酸和 1nmolATP 转化为 1nmol 果糖-1,6-二磷酸和 1nmol ADP 定义为一个酶活力单位。

$$\text{PFK (U/g 质量)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 535 \times \Delta A \div W$$

(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 果糖-6-磷酸和 1nmolATP 转化为 1nmol 果糖-1,6-二磷酸和 1nmol ADP 定义为一个酶活力单位。

$$\text{PFK (U/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1.07 \times \Delta A$$

V 反总: 反应体系总体积, $2 \times 10^{-4} \text{L}$; ϵ : NADH 摩尔消光系数, $6.22 \times 10^3 \text{L/mol/cm}$; d: 96 孔板光径, 0.6cm; V 样: 加入样本体积, 0.01mL; 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; 500: 细菌或细胞总数, 500 万; 10^9 , 单位换算系数, $1 \text{mol} = 10^9 \text{nmol}$ 。

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 或 25°C , 取小烧杯一只装入一定量的 37°C 或 25°C 蒸馏水, 将此烧杯放入 37°C 或 25°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. 不同匀浆组织中 PFK 活力不一样, 做正式试验之前请坐 1-2 个预实验, 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 $\Delta A < 0.5$, 以提高检测的灵敏度。

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, 用微量石英比色皿测得计算 $\Delta A = A_1 - A_2 = 1.6086 - 1.2986 = 0.31$, 按样本质量计算酶活得:
 $\text{PFK (U/g 质量)} = 535 \times \Delta A \div W = 535 \times 0.31 \div 0.1 = 1658.5 \text{ U/g 质量}$ 。
- 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, 用微量石英比色皿测得计算 $\Delta A = A_1 - A_2 = 1.7025 - 1.6159 = 0.0866$, 按样本质量计算酶活得:
 $\text{PFK (U/g 质量)} = 535 \times \Delta A \div W = 535 \times 0.057 \div 0.1 = 463.31 \text{ U/g 质量}$ 。

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.