

果糖-6-磷酸激酶试剂盒说明书

(货号: ADS-F-T003 分光法 48 样)

有效期: 3 个月

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℃ 保存;

试剂一: 液体 40mL×1 瓶, 4℃ 保存;

试剂二: 粉剂×1 瓶, -20℃ 保存, 临用前加入 2.8mL 双蒸水充分溶解备用;

试剂三: 粉剂×1 支, 4℃ 保存, 临用前加入 260ul 双蒸水充分溶解备用;

试剂四: 液体×1 支, 4℃ 保存, 临用前加入 260ul 双蒸水充分溶解备用;

PFK 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。

样本的前处理

1、细菌、细胞或组织样品的制备

细菌或细胞处理: 收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 按照每 200 万细菌或细胞加入 400μL 提取液, 超声波破碎细菌或细胞 (功率 20%, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次); 8000g 4℃ 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

组织处理: 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。

2、血清 (浆) 样品: 直接检测。

测定步骤和加样表

试剂名称 (μL)	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 1 mL 石英比色皿中, 加样本的同时开始计时; 在 340 nm 波长下记录 20 秒时的初始吸光度 A_1 , 准确反应 10 分钟; 340 nm 下比色, 记录 10 分 20 秒时的吸光度 A_2 , 计算 $\Delta A = A_1 - A_2$ 。

注意事项

- 1、测定过程中所有试剂和样本在冰上放置, 以免变性和失活。
- 2、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。
- 3、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。

PFK 活力单位的计算

- 1、血清 (浆) PFK 活力的计算:

单位的定义：每升血清（浆）在反应体系中每分钟催化 1 μ mol 果糖-6-磷酸和 1 μ molATP 转化为 1 μ mol 果糖-1,6-二磷酸和 1 μ mol ADP 定义为一个酶活力单位。

$$\text{PFK (U/L)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 321.5 \times \Delta A$$

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。

$$\text{PFK (U/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T = 321.5 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

（2）按样本鲜重计算

单位的定义：37℃，PH9.0 条件下，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。

$$\text{PFK (U/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T = 321.5 \times \Delta A \div W$$

（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 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。

$$\text{PFK (U/10}^4\text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times 500) \div T = 0.643 \times \Delta A$$

V 反总：反应体系总体积，2.×10⁻⁴ L； ϵ ：NADH 摩尔消光系数，6.22×10³L/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；C_{pr}：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样品质量，g；500：细菌或细胞总数，500 万。