

## 果糖-6-磷酸激酶（PFK）检测试剂盒（微量法）

**注意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。**

### 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<sup>+</sup>，在 340nm 下测定 NADH 下降速率，即可反映 PFK 活性。

### 试剂组成和配制：

提取液：液体 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 8μL×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（10<sup>4</sup> 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；
  - (4) 在微量石英比色皿或 96 孔板中加入 10μL 样本、10μL 试剂三、10μL 试剂四和 170μL 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 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。

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

**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 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。

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

**(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 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。

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

**(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 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。

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

V 反总：反应体系总体积， $2 \times 10^4$  L;

$\epsilon$ ：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，0.01 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 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。

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

**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 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。

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

**(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 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。

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

**(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 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。

$$\text{PFK (nmol/min /}10^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (2000 \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 0.321 \times \Delta A$$

V 反总：反应体系总体积， $2 \times 10^4$  L;

$\epsilon$ ：NADH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3$  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。