

果糖-6-磷酸激酶（PFK）检测试剂盒（分光光度法）

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⁺，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 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 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℃ 保存，临用前加入 260μL 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 16μL×1 支，4℃ 保存，临用前加入 260μL 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（10⁴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℃(哺乳动物)或 25℃(其它物种)预热 10 分钟。

4、加样表：

试剂名称 (μL)	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 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。

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

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 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。

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

(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 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。

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

(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 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。

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

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。