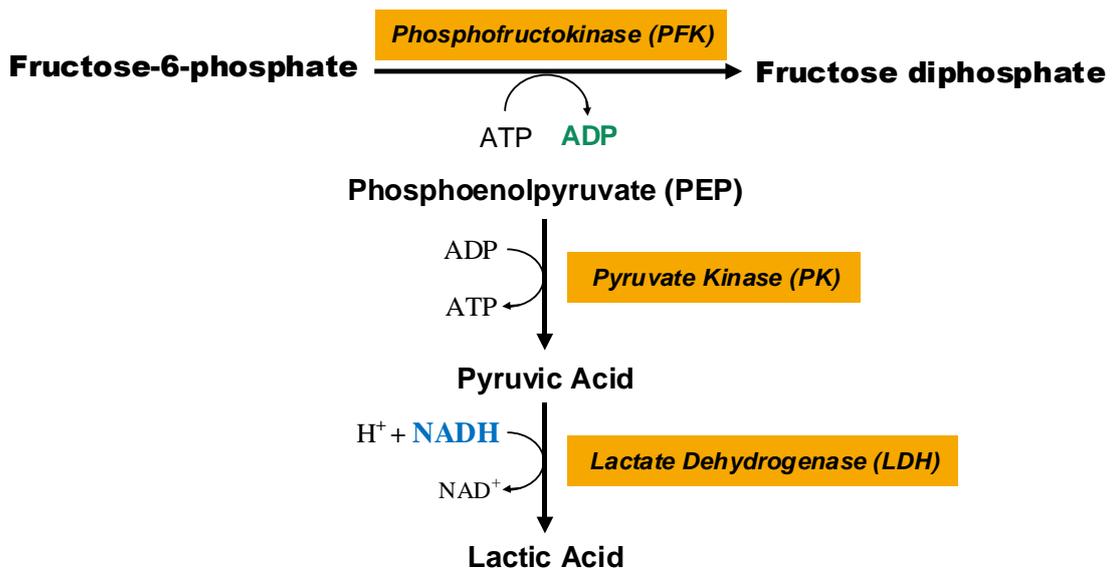




磷酸果糖激酶 (PFK) 活性检测试剂盒
Phosphofructokinase (PFK) Activity Assay Kit



北京盒子生工科技有限公司
Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.



磷酸果糖激酶 (PFK) 活性检测试剂盒

Phosphofructokinase (PFK) Activity Assay Kit

一、产品描述

磷酸果糖激酶(PFK)可催化果糖-6-磷酸转化为果糖二磷酸,即糖酵解途径的第二次磷酸化反应,作为糖酵解过程中的主要限速酶及主要调节点,糖酵解的速度主要取决于磷酸果糖激酶的活性,其活性测定对于糖酵解通量分析、临床医学和信号传导机制等研究具有重要意义。

磷酸果糖激酶能够催化果糖-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依次催化 NADH 氧化生成 NAD⁺,NADH 在 340 nm 处具有特征吸收峰,通过吸光值的下降速率即可表征磷酸果糖激酶的活性。

二、产品内容

名称	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液	液体 60 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂一	粉剂×2 瓶	-20°C 避光保存	使用前每瓶加入 1.5 mL 蒸馏水充分溶解 (-20°C 分装可保存一周,避免反复冻融)
试剂二	液体 45 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂三	液体 50 μL×1 支	-20°C 保存	使用前按试剂三:蒸馏水=1:7 的体积比配置 (根据使用量现用现配)
试剂四	液体 30 μL×1 支	4°C 保存	使用前按试剂四:蒸馏水=8:130 的体积比配置 (根据使用量现用现配)
PFK 工作液的制备 (现用现配): 根据使用量按试剂一:试剂二=1:15 的体积比配置。			

三、产品使用说明

测定过程中所需要的仪器和试剂:紫外分光光度计、1 mL 石英比色皿 (光径=10 mm)、研钵/匀浆器、可调式移液器、台式离心机、恒温水浴/培养箱和蒸馏水。

1.粗酶液的制备 (可根据预实验结果适当调整样本量及比例)

①细菌或细胞:离心收集细菌或细胞到离心管内,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1000万细菌或细胞加入1mL提取液)处理样品,冰浴超声破碎(功率20%或200W,超声3s,间隔10s,重复30次),4°C 8000g离心10min,取上清置于冰上待测。

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 0.1 g 组织，加入 1 mL 提取液）处理样品，冰浴匀浆，4℃ 8000 g 离心 10 min，取上清置于冰上待测。

③血清（浆）、培养液等液体样本：直接检测或适当稀释后再进行检测。

2.测定步骤

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

②在 1 mL 石英比色皿中依次加入下列试剂：

试剂	测定组 (μL)
PFK 工作液	800
粗酶液	30
试剂三	5
试剂四	5

吸光值测定：①迅速混匀并开始计时，测定 20 s（总时间）时 340 nm 处吸光值，记为 A1；②37℃（哺乳动物）或 25℃（其他物种）准确反应 600 s 后，测定 620 s（总时间）时 340 nm 处吸光值，记为 A2；③计算 $\Delta A = A1 - A2$ 。

3.磷酸果糖激酶（PFK）活性计算

①按组织蛋白浓度计算

单位定义：每 mg 组织蛋白在反应体系中每分钟催化 1 nmol 果糖-6-磷酸和 1 nmol ATP 转化为 1 nmol 果糖-1,6-二磷酸和 1 nmol ADP 定义为一个酶活力单位。

$$\text{PFK (U/mg prot)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times 10^9}{\epsilon \times d \times V_{\text{样}} \times \text{Cpr} \times T} = \frac{450 \times \Delta A}{\text{Cpr}}$$

②按组织样本质量计算

单位定义：每 g 组织在反应体系中每分钟催化 1 nmol 果糖-6-磷酸和 1 nmol ATP 转化为 1 nmol 果糖-1,6-二磷酸和 1 nmol ADP 定义为一个酶活力单位。

$$\text{PFK (U/g)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{样总}} \times 10^9}{\epsilon \times d \times V_{\text{样}} \times W \times T} = \frac{450 \times \Delta A}{W}$$

③按细菌或细胞数量计算

单位定义：每 10^4 个细菌或细胞在反应体系中每分钟催化 1 nmol 果糖-6-磷酸和 1 nmol ATP 转化为 1 nmol 果糖-1,6-二磷酸和 1 nmol ADP 定义为一个酶活力单位。

$$\text{PFK (U/10}^4 \text{ cell)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{样总}} \times 10^9}{\epsilon \times d \times V_{\text{样}} \times \text{细菌或细胞数量} \times T} = \frac{450 \times \Delta A}{\text{细菌或细胞数量}}$$

④按液体样本体积计算

单位定义：每 mL 液体样本在反应体系中每分钟催化 1 nmol 果糖-6-磷酸和 1 nmol ATP 转化为 1 nmol 果糖-1,6-二磷酸和 1 nmol ADP 定义为一个酶活力单位。

$$\text{PFK (U/mL)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times 10^9}{\epsilon \times d \times V_{\text{样}} \times T} = 450 \times \Delta A$$

注释： V 样：反应体系中加入粗酶液的体积，30 μL =0.03 mL； V 样总：粗酶液总体积，1 mL； 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：1 mL 石英比色皿光径，1 cm； T：反应时间，600 s=10 min； W：样本质量，g； Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL； 细菌或细胞数量：以万计； 10^9 ：单位换算系数，1 mol= 10^9 nmol。

四、注意事项

- ①测定过程中试剂三、试剂四和粗酶液应置于冰上放置以免失活；
- ②准确在相应时间点完成吸光值的测定，以保证实验结果的准确性；
- ③若 $\Delta A \geq 0.5$ 建议将粗酶液使用**提取液**适当稀释后再进行测定，或适当缩短反应时间使 $\Delta A < 0.5$ ，以提高检测的灵敏度，计算时相应修改稀释倍数和反应时间；
- ④为保证结果准确且避免试剂损失，测定前请仔细阅读说明书（以实际收到说明书内容为准），确认试剂储存和准备是否充分，操作步骤是否清楚，且务必取 2-3 个预期差异较大的样本进行预测定，过程中问题请您及时与工作人员联系。

For Research Use Only. Not for Use in Diagnostic Procedures.

boxbio

Manufactured and Distributed by

Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.
Liandong U Valley, Tongzhou District, Beijing, China
TEL: 400-805-8228
E-MAIL: techsupport@boxbio.cn
Copyright © 2020 Boxbio, All Rights Reserved.

