

## 果糖-6-磷酸激酶（PFK）活性检测试剂盒说明书

产品货号	产品名称	包装规格	测定方法
PMHB5-M96	果糖-6-磷酸激酶（PFK）活性检测试剂盒	96T	微量法

### 一、测定意义

PFK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。

### 二、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。

### 三、试剂组成

试剂名称	试剂装量(96T)	保存条件
提取液	液体 120mL×1 瓶	4-8℃ 保存
试剂一	液体 20mL×1 瓶	4-8℃ 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℃ 保存，禁止反复冻融；		
试剂三	粉剂 ×1 瓶	4-8℃ 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℃ 保存，禁止反复冻融；		
试剂四	液体 16μL×1 支	4-8℃ 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℃ 保存，禁止反复冻融；		

### 四、操作步骤

#### 样本前处理

植物组织提取液的制备：取一定量植物组织擦净水分及杂质，剪碎后放入研钵，加入液氮，研磨成粉状后转移出来，然后准确称重，按照组织质量（g）：提取液体积(mL)为 1：5~10 的比例（建议称重 0.1g，加入提取液 1mL），旋涡混匀抽提 3-5 分钟或者使用组织破碎仪冰浴提取，8000g，4℃ 离心 10min，取上清，置冰上待测。

### 五、测定步骤

- 1、酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 340nm，蒸馏水调零。
- 2、测定前将试剂恢复至常温；
- 3、工作液的配制：按照试剂一：试剂二：试剂三：试剂四=180:8:1:1 的比例配制工作液，现用现配；
- 4、在微量石英比色皿或 96 孔UV板中加入 10μL 样本、190μL 工作液，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  $\Delta A=A1-A2$ 。

## 六、果糖-6-磷酸激酶（PFK）活性计算

a.用微量石英比色皿测定的计算公式如下

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。

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

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。

b.用 96 孔 UV 板测定的计算公式如下

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。

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

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。

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

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 UV 板光径, 0.6cm; 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。

## 七、 注意事项

- 1、正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。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。
- 2、试剂按照要求冷冻分装, 不能反复冻融。

## 八、公司介绍

陌凡生物科技有限公司是一家专业从事转基因检测、食品安全以及动植物疫病检测为核心业务的生物科技公司。能够为客户提供动植物疫病检测试剂、小分子抗原抗体、植物激素、植物抗体、重组蛋白等优质产品。自主研发了涵盖分子生物学、细胞生物学、免疫学、生物医学等领域的各种试剂盒。产品覆盖面广, 品质可靠。