

磷酸果糖激酶 (PFK) /6-磷酸果糖激酶/果糖-6-磷酸激酶检测试剂盒 (微量法)

货号: PMK1122

保存: -20℃避光保存 12 个月

规格: 48T/96T

适用样本: 血清 (浆)、动植物组织/细胞、细胞上清、细菌

产品简介

磷酸果糖激酶 (PFK, EC 2.7.1.11), 又称为 6-磷酸果糖激酶或果糖-6-磷酸激酶, 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。本试剂盒提供了一种简单的检测方法, 用于检测生物样本中磷酸果糖激酶 (PFK) 活性。其原理是 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⁺, NADH 在 340nm 有特征吸收峰, 而 NAD⁺没有, 通过测定 340nm 光吸收下降速率, 即可反映 PFK 活性。

产品内容

试剂盒组分	规格		储存条件
	48T	96T	
提取液	50mL	100mL	4℃, 保存
试剂一	10mL	20mL	4℃, 保存
试剂二	1	1	4℃, 避光保存
试剂三	500 μL	1mL	-20℃, 避光保存
试剂四	500 μL	1mL	-20℃, 避光保存

自备耗材

酶标仪或紫外分光光度计 (能测 340nm 处的吸光度) 及恒温培养箱
 96 孔 UV 板或微量石英比色皿、移液枪及枪头
 去离子水
 匀浆器 (如果是组织样本)

试剂准备

注意: 各组分 (小管试剂) 开盖前, 请先低速离心。

提取液: 即用型; 使用前, 平衡到室温; 4℃保存。

试剂一: 即用型; 使用前, 平衡到室温; 4℃保存。

试剂二: 临用前配制, 加入试剂一和去离子水充分溶解。48T 的试剂盒需要 8.5mL 试剂一和 0.565mL 去离子水; 96T 试剂盒需要 17mL 试剂一和 1.13mL 去离子水), 未用完的已溶解的试剂二可 4℃保存一周。若需长期保存, 请分装后-20℃保存, 避免反复冻融。

试剂三: 即用型; 使用前, 平衡到室温; -20℃避光保存。

试剂四: 即用型; 使用前, 平衡到室温; -20℃避光保存。

样本制备

1. 动物组织: 称取约 0.1g 样本, 加入 1mL 提取液, 冰浴匀浆, 8,000g, 4℃离心 10min, 取上清液置冰上待测。
2. 植物组织: 称取约 0.1g 样本, 加入 1mL 提取液捣碎, 冰浴超声波破碎 5min (功率 20%或 200W, 超声 3s, 间隔 7s, 重复 30 次), 8,000g, 4℃离心 10min, 取上清液, 置冰上待测。

产品说明书

3. 细胞或细菌：收集 500 万细胞或细菌到离心管内，用冷 PBS 清洗细胞，离心后弃上清，加入 1mL 提取液，冰浴超声波破碎细胞或细菌 5min（功率 20%或 200W，超声 3s，间隔 7s，重复 30 次），然后 8,000g，4℃离心 10min，取上清液，置冰上待测。

4. 血清（浆）：直接测定。

注意：1. 推荐使用新鲜样本，如果不立即进行实验，样本可在-80℃保存 1 个月。如需测定蛋白浓度，推荐使用 BCA 法蛋白质定量试剂盒进行样本蛋白质浓度测定。

2. 对于脂肪含量较高的动物组织，离心后移除上层脂肪，再取上清液。

实验步骤

1. 酶标仪或紫外分光光度计预热 30min 以上，调节波长到 340nm，紫外分光光度计去离子水调零。
2. 测定孔在 96 孔 UV 板或微量石英比色皿中依次加入 10μL 样本、10μL 试剂三、10μL 试剂四和 170μL 已溶解的试剂二，混匀，立即记录 340nm 处 20s 时的吸光值 A_1 和 10min 20s 后的吸光值 A_2 ，计算 $\Delta A = A_1 - A_2$ 。

注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果 ΔA 小于 0.001 可适当加大样本量。如果 ΔA 大于 0.5，样本可用提取液进一步稀释，计算结果乘以稀释倍数，或减少提取用样本量。

结果计算

A. 使用 96 孔 UV 板测定的计算公式

1. 按样本鲜重计算

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

$$\text{PFK (U/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T = 643 \times \Delta A \div W \times n$$

2. 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 1nmol ATP 转化为 1nmol 果糖-1,6-二磷酸和 1nmol ADP 定义为一个酶活力单位。

$$\text{PFK (U/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) \div T = 643 \times \Delta A \div \text{Cpr} \times n$$

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 1nmol ATP 转化为 1nmol 果糖-1,6-二磷酸和 1nmol ADP 定义为一个酶活力单位。

$$\text{PFK (U/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times 500) \div T = 1.286 \times \Delta A \times n$$

4. 按血清（浆）等液体体积计算

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

$$\text{PFK (U/mL)} = [\Delta A \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 643 \times \Delta A \times n$$

$V_{\text{反应}}$ ：反应体系总体积， 2.0×10^{-4} L； ϵ ：NADH 摩尔消光系数， 6.22×10^3 mol/L/cm； d ：96 孔板光径，0.5cm； 10^9 ：1mol=1×10⁹nmol； $V_{\text{样}}$ ：加入样本体积，0.01mL； $V_{\text{样总}}$ ：加入提取液体积，1mL； W ：样品质量，g； T ：反应时间，10min； n ：样本稀释倍数； Cpr ：样本蛋白质浓度，mg/mL；500：细菌或细胞总数，500 万。

B. 使用微量石英比色皿测定的计算公式

将上述计算公式中的光径 d :0.5cm 调整为 d :1cm 进行计算即可。

注意事项

1. 实验过程中请穿戴实验服、口罩和乳胶手套。请按照生物实验室的国家安全规定进行实验，尤其是在检测血样或其他体液时。
2. 本试剂盒仅用于实验室科学研究，如果本试剂盒用于临床诊断或任何其他用途，我们将不对任何后果负责。
3. 本试剂盒应在有效期内使用，并请严格按照说明书进行存储。
4. 不同批次号、不同厂家之间的组分不要混用；否则，可能导致结果异常。
5. 勤换吸头，避免各组分之间的交叉污染。

相关产品：

PMK1116 丙酮酸（PA）检测试剂盒（微量法）

PMK1120 己糖激酶（HK）检测试剂盒（微量法）

PMK1121 丙酮酸激酶（PK）检测试剂盒（微量法）

PMK1123 磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶（PEPC）检测试剂盒（微量法）



产品说明书

更多产品详情了解，请关注公众号：