

果糖磷酸激酶活性测定试剂盒说明书(精简版)

(货号: A129-1-1 6-phosphofructokinase, 分光光度法 50T/48 样)

一、测定意义

果糖磷酸激酶(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转换为果糖-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⁺,在340 nm下测定NADH下降速率,即可反应PFK活性。

三、自备仪器用品

离心机、紫外分光光度、水浴锅、1mL石英比色皿、移液枪、研钵、冰和蒸馏水

四、试剂组成和配制

提取液: 60mL×1 瓶, 4℃保存

试剂一: 40mL×1 瓶, 4℃保存

试剂二: 粉剂×1 瓶, -20℃保存, 临用前加2.8mL蒸馏水充分溶解, 用不完的试剂-20℃分装保存不能反复冻融

试剂三: 粉剂×1 支, 4℃保存, 临用前加0.26mL蒸馏水充分溶解, 用不完的试剂-20℃分装保存不能反复冻融。

试剂四: 液体×1 支, 4℃保存, 临用前加0.26mL蒸馏水充分溶解, 用不完的试剂-20℃分装保存不能反复冻融。

五、样品前处理

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) 500-1000: 1的比例(建议1000万细菌或细胞加入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10秒, 重复30次); 在4℃下8000g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)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

六、测定步骤

1. 分光光度计预热30min 以上, 调节波长到340nm, 用蒸馏水调零。

2. 工作液(可测25个样)的配置: 取19mL试剂一和1.26mL试剂2充分混匀; 用不完的试剂4℃保存一周

3. 将工作液置于37℃(哺乳动物)或25℃(其它物种)预热10min。

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

将上述试剂按照顺序加入1mL石英比色皿中, 立即混匀, 加试剂四的同时开始计时, 记录在340nm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活性不一样, 做正式试验之前请做1-2只预实验, 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, 使得 $\Delta A < 0.5$, 以提高检测灵敏度。

七、PFK活性计算

1、血清(浆)活力的计算:

单位的定义: 每mL 血清(浆)在每分钟催化1nmol果糖-6-磷酸和1nmolATP转换为1nmol果糖-1,6-二磷酸和

1nmolADP定义为一个酶活力单位。

$$PFK(U/mL) = [\Delta A \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V \div T = 450 \times \Delta A$$

2、组织、细菌或细胞中PFK活力计算

(1). 按组织蛋白浓度计算

单位的定义: 每mg组织蛋白每分钟催化1nmol果糖-6-磷酸和1nmolATP转换为1nmol果糖-1,6-二磷酸和1nmolADP定义为一个酶活力单位。

$$PFK(U/mg) = [\Delta A \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (Cpr \times V_{\text{样}}) \div T = 450 \times \Delta A \div Cpr$$

(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转换为1nmol果糖-1,6-二磷酸和1nmolADP定义为一个酶活力单位。

$$PFK(U/mg) = [\Delta A \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 450 \times \Delta A \div W$$

(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转换为1nmol果糖-1,6-二磷酸和1nmolADP定义为一个酶活力单位。

$$PFK(U/mg) = [\Delta A \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (1000 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.45 \times \Delta A$$

ϵ : NADH在340nm 处摩尔吸光系数为 $6.22 \times 10^3 \text{L/mol/cm}$;

d : 比色皿光径 (cm), 1cm;

$V_{\text{反应}}$: 反应体系总体 (L), $840\mu\text{L} = 8.4 \times 10^{-4}\text{L}$;

10^9 : $1\text{mol} = 1 \times 10^9\text{nmol}$;

Cpr : 上清液蛋白质浓度 (mg/mL)

$V_{\text{样}}$: 加入反应体系中上清液体积 (mL), $30\mu\text{L} = 0.03\text{mL}$;

$V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积, 1mL

T : 催化反应时间 (min), 10min。

W , 样本质量, (g)

1000: 细菌或细胞总数, 1000万。