

## 磷酸果糖激酶（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
AMHF1-M48	磷酸果糖激酶（PFK）活性检测试剂盒	48T	微量法
AMHF1-M96		96T	

### 一、测定意义：

磷酸果糖激酶（PFK）是糖酵过程中起调控作用的限速酶，这种酶存在于细菌、植物和动物中，磷酸果糖激酶（PFK）催化糖酵解的第三步，即果糖-6-磷酸转化为果糖-1,6-二磷酸，即糖酵解的限速步骤。PFK 活性除转化后修饰外，还受多种辅助因子的高度调控，可用于测量组织中的糖酵解通量。

### 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(48T)	试剂装量(96T)	保存条件
提取液	液体 60mL×1 瓶	液体 110mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 10mL×1 瓶	液体 20mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	液体 8mL×1 瓶	液体 15mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂三	粉剂×1 支	粉剂×2 支	-20℃保存
<b>试剂三的配制：</b> 每支加 1.5ml 试剂一，混合均匀，现用现配，配完-20℃可保存一周。			
试剂四	粉剂×1 支	粉剂×2 支	-20℃保存
<b>试剂四的配制：</b> 每支加 1.5ml 试剂一，混合均匀，现用现配，配完-20℃可保存一周。			
试剂五	粉剂×1 支	粉剂×2 支	-20℃保存
<b>试剂五的配制：</b> 每支加 1.2ml 水，混合均匀，现用现配，配完-20℃可保存一周。			
试剂六	粉剂×1 支	粉剂×2 支	-20℃保存
<b>试剂六的配制：</b> 每支加 1.2ml 水，混合均匀，现用现配，配完-20℃可保存一周。			
试剂七	粉剂×1 瓶	粉剂×2 瓶	-20℃保存
<b>试剂七的配制：</b> 每支加 5ml 水，混合均匀，现用现配，配完-20℃			

可保存一周。

**工作液的配制：**按试剂一：试剂二：试剂三：试剂四：试剂五：试剂六=3:2:1:1:1:1 的比例配制，混合均匀，现用现配。

### 四、操作步骤：

#### 样本前处理

1、组织：按照组织质量 (g) :提取液(mL)为 1:10 的比例（建议称取 0.1 g 组织，加入 1 mL 提取液）进行冰浴匀浆。5000 rpm, 4℃离心 10 min，取上清置冰上待测。

2、细菌、细胞：按照细胞数量 10<sup>4</sup> 个 : 提取液体积 (mL) 500~1000:1 的比例（建议 500 万细胞加入 1 mL 提取液），冰浴超声波破碎细胞（功率 300w, 超声 3s, 间隔 7s, 总时间 3 min），5000 rpm, 4℃离心 10min，取上清置冰上待测。

3、血清（浆）等液体样本：直接检测或适当稀释后进行检测。

#### 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、操作表（在离心管中加入以下试剂）：

试剂名称	测定管	空白管
上清液 (μL)	10	-
蒸馏水 (μL)	-	10
工作液 (μL)	180	180
试剂七 (μL)	20	20

充分混匀，8000g 离心 10min，取上清于 96 孔 UV 板中测定 340nm 处吸光值，记为 A<sub>测定</sub> 和 A<sub>空白</sub>，计算  $\Delta A_{测定} = A_{测定} - A_{空白}$ 。注：空白管只需测定 1-2 次。

### 五、磷酸果糖激酶（PFK）活性计算：

#### 1、按样本鲜重计算：

**单位定义：**每克组织每分钟消耗 1nmol NADH 为一个酶活力单位。

**计算公式：**PFK (nmol/min/g) =  $[\Delta A \times V_{反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{样} \div$

$$V_{\text{样总}} \times W \div T = 1125.2 \times \Delta A \div W$$

2、按样本蛋白浓度计算：

**单位定义：**每毫克蛋白每分钟消耗 1nmol NADH 为一个酶活力单位。

**计算公式：**PKF (nmol/min/mg prot) =  $[\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\varepsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 1125.2 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$

3、按细菌或细胞数量计算：

**单位定义：**每 1 万个细菌或细胞每分钟消耗 1 nmol NADH 为一个酶活力单位。

**计算公式：**PKF (nmol/min/10<sup>4</sup> cell) =  $[\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\varepsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times 500) \div T = 2.25 \times \Delta A$

4、按血清（浆）体积计算：

**单位定义：**每毫升液体每分钟消耗 1nmol NADH 的量为一个酶活单位。

**计算公式：**PKF 活性 (nmol/min/mL) =  $[\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\varepsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 1125.2 \times \Delta A$

**V<sub>反总</sub>：**反应体系总体积, 2.1×10<sup>-4</sup> L; **ε：**NADH 摩尔消光系数,

6.22×10<sup>3</sup> L/mol/cm; **d：**96 孔板光径, 0.6cm; **V<sub>样</sub>：**加入样本体积,

0.01mL; **V<sub>样总</sub>：**加入提取液体积, 1mL; **T：**反应时间, 5min; **C<sub>pr</sub>：**

样本蛋白质浓度, mg/mL; **10<sup>9</sup>：**单位换算系数, 1mol=10<sup>9</sup>nmol; **W：**

样本质量, g; **500：**细菌或细胞总数, 500 万。

## 六、注意事项：

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。

## 【厂家信息】

生产企业：南京陌凡生物科技有限公司

地址：南京市栖霞区红枫科技园 A6 栋 2 层

## 【售后微信】



## 【说明书核准及修改日期】

核准日期：2025 年 4 月 7 日

修改日期：2025 年 4 月 7 日