

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

产品货号: E-BC-K612-M

产品规格: 48T(48 samples)/96T(96 samples)

检测仪器: 酶标仪(330-350 nm)

Elabscience®磷酸果糖激酶 (PFK) 比色法试剂盒 Phosphofructokinase (PFK) Activity Assay Kit

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话: 400-999-2100

邮箱: biochemical@elabscience.cn

网址: www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。

联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

用途

本试剂盒适用于检测血清(浆)、动物组织和细胞样本中磷酸果糖激酶(PFK)的活力。

检测原理

磷酸果糖激酶又叫 6-磷酸果糖激酶 (Phosphofructokinase; PFK) 是一类激酶,可作用于果糖-6-磷酸。磷酸果糖激酶催化果糖-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,即可反映 PFK 活性。

本试剂盒检测组织或细胞样本时,需测定总蛋白浓度,推荐使用本公司 BCA 试剂盒(货号 E-BC-K318-M)进行测定。

提供试剂和物品

编号	名称	规格 1 (Size 1)(48 T)	规格 2 (Size 2)(96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	缓冲液 (Buffer Solution)	10 mL×1 瓶	20 mL×1 瓶	-20℃ 避光 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	底物 A (Substrate A)	粉剂×1 支	粉剂×2 支	-20℃ 避光 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	底物 B (Substrate B)	粉剂×1 支	粉剂×2 支	-20℃ 避光 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	酶试剂 (Enzyme Reagent)	粉剂×1 支	粉剂×2 支	-20℃ 避光 保存 6 个月
	96 孔 UV 酶标板	1 板		
	96 孔覆膜	2 张		
	样本位置标记表	1 张		

说明:试剂严格按上表中的保存条件保存,不同测试盒中的试剂不能混用。

对于体积较少的试剂,使用前请先离心,以免量取不到足够量的试剂。

所需自备物品

仪器：酶标仪(330-350 nm, 最佳检测波长 340 nm)

试剂：生理盐水(0.9% NaCl)

试剂准备

① 检测前, 各试剂平衡至室温。

② 工作液配制:

用10 mL试剂一溶解一支试剂二和一支试剂三, 未用完部分进行分装, -20 ℃避光保存3天。

③ 试剂四工作液配制:

取一支试剂四加入1.2 mL双蒸水混匀溶解, 置于冰盒上避光待用, 未用完部分-20 ℃避光保存7天。

样本准备

① 样本处理

血清(浆)等液体样品: 直接测定。

组织样本: 组织样本使用生理盐水 (0.9% NaCl) 匀浆处理, 离心后, 取上清待测, 留取部分上清用于蛋白浓度测定。

细胞样本: 取 1×10^6 细胞加入200 μ L生理盐水 (0.9% NaCl) 匀浆处理, 取上清待测, 一部分上清用于蛋白浓度测定。

② 样本的稀释

在正式检测前，需选择2-3个预期差异大的样本稀释成不同浓度进行预实验，根据预实验的结果，结合本试剂盒的线性范围：0.27-32.29 U/L，请参考下表稀释(仅供参考)：

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
10%大鼠肝组织	不稀释	10%大鼠肾组织	不稀释
10%大鼠脑组织	不稀释	10%小鼠肝组织	不稀释
10%小鼠脾组织	不稀释	10%小鼠肾组织	不稀释
Jurkat 细胞	不稀释	10%小鼠心组织	不稀释
大鼠血清	不稀释	大鼠血浆	不稀释

注：稀释液为生理盐水（0.9% NaCl）。

实验关键点

- ① 工作液需要-20℃避光保存，避免反复冻融。
- ② 试剂二、三、四需要-20℃严格避光保存。

操作步骤

- ① 取 10 μL 待测样本加入到各酶标孔中。
- ② 向步骤①中各孔依次加入 20 μL 试剂四工作液。
- ③ 向步骤②中各孔依次加入 170 μL 工作液，立即记录酶标仪 340 nm 处 20 s 时的吸光值 A_1 和 5 min 20 s 时的吸光值 A_2 ，计算 $\Delta A = A_1 - A_2$ 。

操作表

	测定孔
待测样本(μL)	10
试剂四工作液(μL)	20
工作液(μL)	170
酶标仪 340 nm 处测定 20 s 时的吸光值 A_1 和 5 min 20 s 时的吸光值 A_2 ，计算 $\Delta A = A_1 - A_2$ 。	

本试剂盒检测组织或细胞样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用本公司 BCA 试剂盒(货号 E-BC-K318-M)进行测定。

结果计算

组织和细胞样本中磷酸果糖激酶（PFK）活力计算公式

定义：室温下，每克组织或细胞蛋白每分钟消耗 1 μmol NADH 所需的酶量定义为一个酶活力单位。

$$\text{PFK 活性 (U/gprot)} = \frac{\Delta A_{340}}{6220 \times d} \div C_{\text{pr}} \div T \times f \times 10^6$$

血清(浆)样本中磷酸果糖激酶（PFK）活力计算公式：

定义：室温下，每升血清(浆)每分钟消耗 1 μmol NADH 所需的酶量定义为一个酶活力单位。

$$\text{PFK 活性 (U/L)} = \frac{\Delta A_{340}}{6220 \times d} \div T \times f \times 10^6$$

注解：

ΔA₃₄₀: A₁-A₂ (20 s 时的吸光值 A₁-5 min 20 s 时的吸光值 A₂)

6220: NADH 摩尔吸光系数 L/mol⁻¹cm

d: 96 孔 UV 酶标板板径 0.6 cm

C_{pr}: 样本蛋白浓度 gprot/L

T: 样本反应时间, 5 min

f: 样本加入检测体系前的稀释倍数

10⁶: 1 mol/L=1000000 μmol/L

附录1 关键数据

1. 技术参数

检测范围	0.27-32.29 U/L	平均批间差	8.0 %
灵敏度	0.27 U/L	平均批内差	3.0 %
平均回收率	100.0 %		

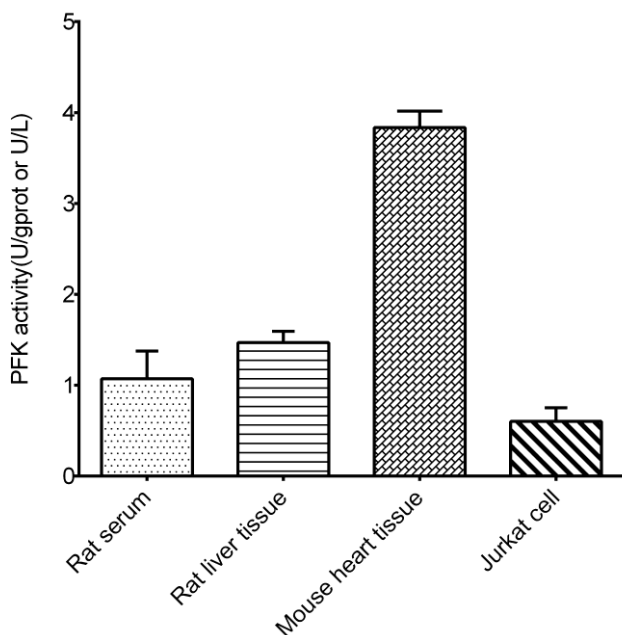
附录2 实例分析

例如检测大鼠肝组织(数据仅供参考):

取10%大鼠肝组织匀浆上清液10 μL , 按操作表操作, 结果如下: 测定初始OD值 A_1 为1.245, 测定OD值 A_2 为0.849, 10%大鼠肝组织匀浆蛋白浓度为14.45 gprot/L计算结果为:

$$\text{PFK 活力} = (1.245 - 0.849) \div (6220 \times 0.6) \div 14.45 \div 5 \times 10^6 = 1.47 \text{ U/gprot} \text{ (U/gprot)}$$

按照说明书操作, 测定大鼠血清(加样量10 μL)、大鼠肝组织(10%匀浆蛋白浓度为14.45 gprot/L, 加样量10 μL)、小鼠心组织(10%匀浆蛋白浓度为7.78 gprot/L, 加样量10 μL)和Jurkat细胞(蛋白浓度为2.27 gprot/L, 加样量10 μL)中PFK活力(如下图):



附录3 问题答疑

问题	可能原因	建议解决方案
初始 OD 值 小于 0.8	工作液配制时间过久	保证工作液在一周内使用完毕
	样本的酶活较高	增大样本的稀释倍数
变化 OD 值 较小	样本稀释倍数较大	减小样本稀释倍数
	选取的样本不新鲜	尽量选择新鲜的样本测定

声明

1. 试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，我公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器，严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责，使用前请充分考虑样本可能的使用量，预留充足的样本。