焦磷酸：果糖-6-磷酸-1-磷酸转移酶（Pyrophosphate: fructose-6 – phosphate-1-phosphoric acid transferase，PFP）试剂盒说明书

（货号：G0607W 微板法 96 样）

一、产品简介：

焦磷酸：果糖-6-磷酸-1-磷酸转移酶（PFP，EC2.7.1.90）是一种胞质酶，广泛存在于植物组织中，催化果糖-6-磷酸与果糖-1,6-二磷酸之间的可逆转化，在光合作用碳代谢中起重要作用。

PFP 催化 6-磷酸果糖转化为 1,6-二磷酸果糖，接着在醛缩酶和磷酸丙糖异构酶的作用下转变为磷酸二羟丙酮，再由 3-磷酸甘油脱氢酶催化，并使 NADH 在 340nm 处的吸光度下降，由此反映 PFP 酶活性高低。

二、试剂盒的组成和配制：

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 120mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉剂 mg×2 支	-20℃保存	用前甩几下使试剂落入底部，每支再加 3.1mL 的蒸馏水溶解，用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融，三天内用完。
试剂二	液体μL×1 瓶	-20℃保存	用前甩几下使试剂落入底部，再加 6.1mL 的蒸馏水溶解
试剂三	液体 2.2mL×1 瓶	4℃保存	

三、所需的仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、低温离心机、可调式移液器、移液枪、研钵、冰和蒸馏水。

四、焦磷酸：果糖-6-磷酸-1-磷酸转移酶（PFP）酶活测定：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

1、样本制备：

称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液，进行冰浴匀浆。12000rpm，4℃离心 20min，取上清置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照组织质量（g）：提取液体积(mL)为 1：5~10 的比例进行提取

2、上机检测：

① 酶标仪预热 30 min 以上，调节波长到 340nm。

② 所有试剂解冻至室温（25℃）。

③ 依次在 96 孔板中加入：

试剂名称（μL）	测定管
样本	20
提取液	60
试剂一	60
试剂二	60
试剂三	20
混匀，室温（25℃）条件下，10s 时于 340nm 处读取吸光值 A1，20min 后读取吸光值 A2，△A=A1-A2。	

【注】1. 若△A 的值在零附近，可以适当延长反应时间到 30min 或更长读取 A2，改变后的反

应时间需代入计算公式重新计算。或适当加大样本量，则改变后的加样体积 V1 需代入计算公式重新计算。

2. 若起始值 A1 太大如超过 2（如颜色较深的植物叶片，一般色素较高，则起始值相对会偏高），可以适当减少样本加样量，则改变后的加样体积需代入计算公式重新计算。或向待测样本中加少许活性炭混匀静置 5min 后 12000rpm, 4℃离心 10min，上清液用于检测；
3. 若ΔA 的值大于 0.5，则需减少反应时间（如减少至 5min），则改变后的反应时间 T 需代入计算公式重新计算。
4. 若下降趋势不稳定，可以每隔 10S 读取一次吸光值，选取一段线性下降的时间段来参与计算，相对应的 A 值也代入计算公式重新计算。

五、结果计算：

1、按照样本蛋白浓度计算

酶活定义：每毫克组织蛋白每分钟消耗 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

PFP（nmol/min/mg prot）＝[ΔA÷（ε×d）×V2×10^9]÷(Cpr×V1÷V) ÷T=160.77×ΔA÷Cpr

2、按照样本质量计算

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

PFP（nmol/min/g 鲜重）＝[ΔA÷（ε×d）×V2×10^9]÷(W ×V1÷V) ÷T=160.77×ΔA÷W

ε：NADH 摩尔消光系数，6.22×10^3 L / mol /cm；　　d：比色皿光径，0.5cm；

V：加入提取液体积，1mL；　　V1：加入样本体积，0.02mL；

V2：反应体系总体积，0.2mL=2×10^{-4}L；　　T：反应时间，20 min；

W：样本质量，g

Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。