

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×3 支	-20℃保存	使用前甩几下使试剂落入底部，每支再加 1.1mL 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 3mL×1 支	4℃保存	
试剂三	液体 μL×1 瓶	-20℃保存	使用前甩几下使试剂落入底部，再加 6.5mL 的蒸馏水溶解。用不完的试剂可分装后-20℃保存，避免反复冻融。
试剂四	液体 2.2mL×1 支	4℃保存	

三、所需的仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、低温离心机、恒温水浴锅、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℃）或 25℃水浴条件下孵育 5-15min。
- ③ 试剂一和二可按照 30:30 比例配成混合液（一枪加 60μL 该混合液），试剂三和四可按照 60:20 比例配成混合液（一枪加 80μL 该混合液），（所有混合液用多少配多少，现配现用）。
- ④ 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	30
试剂二	30
试剂三	60
试剂四	20
混匀，室温 (25°C) 条件下，10s 时于 340nm 处读取吸光值 A1，20min 后读取吸光值 A2， $\Delta A=A1-A2$ 。	

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。

$$PFP(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot})=[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (Cpr \times V1 \div V) \div T = 160.77 \times \Delta A \div Cpr$$

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。

$$PFP(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重})=[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T = 160.77 \times \Delta A \div W$$

ϵ ---NADH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3 \text{ L} / \text{mol} / \text{cm}$ ；

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， $0.2\text{mL}=2 \times 10^{-4}\text{L}$ ；

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。