

# 焦磷酸：果糖-6-磷酸-1-磷酸转移酶（PFP）活性检测试剂盒说明书

微量法

**注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。**

货号：AC10589

规格：100T/96S

**产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系本公司工作人员。**

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 110 mL×1 瓶	4°C保存
试剂一	液体 15 mL×1 瓶	4°C保存
试剂二	粉剂×1 瓶	-20°C保存
试剂三	粉剂×1 瓶	-20°C保存
试剂四	粉剂×2 支	4°C保存
试剂五	粉剂×1 支	-20°C保存
试剂六	液体 30 μL×1 支	4°C保存

溶液的配制：

- 1、试剂二：临用前加 2.5 mL 蒸馏水充分溶解；用不完的试剂分装后-20°C保存两周，禁止反复冻融。
- 2、试剂三：临用前加 2.5 mL 蒸馏水充分溶解；用不完的试剂分装后-20°C保存两周，禁止反复冻融。
- 3、试剂四：临用前取 1 支加入 0.3mL 蒸馏水溶解，4°C保存一周。（1 支溶解后可做 100T，为了延长使用时间，此产品多给 1 支粉剂）
- 4、试剂五：临用前加入 0.3 mL 蒸馏水溶解，-20°C分装保存两周，禁止反复冻融。
- 5、试剂六：临用前加入 0.3 mL 蒸馏水溶解，4°C保存一周，也可按比例现用现配。

## 产品说明：

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，与磷酸果糖激酶一样催化果糖-6-磷酸的磷酸化，单 PEP 催化反应为可逆反应，并以焦磷酸代替 ATP，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，它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 α-磷酸甘油脱氢酶和 NADH 催化生成 3-二磷酸甘油和 NAD，340nm 处的吸光度变化反映了 PFP 的活性的高低。

**注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。**

## 需自备的仪器和用品：

可见分光光度计/酶标仪、低温离心机、水浴锅/恒温培养箱、微量石英比色皿/96 孔 UV 板、可调式移液枪、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水、EP 管。

## 操作步骤：

### 一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

1、组织：按照质量（g）：提取液体积(mL)为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1 g，加入 1 mL 提取液）加入提取液，冰浴匀浆后于 4℃，20000g 离心 15min，取上清置冰上待测；

2、细胞：按照细胞数量（10<sup>4</sup>个）：提取液体积（mL）为 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 3 s，间隔 7 s，总时间 3 min）；然后 4℃，20000g 离心 15min，取上清置冰上待测；

3、液体：直接检测。

### 二、测定步骤

1、分光光度计/酶标仪预热 30 min 以上，调节波长至 340 nm，蒸馏水调零。

2、操作表：

试剂名称（ $\mu\text{L}$ ）	测定管	空白管
试剂一	134	134
试剂二	20	20
试剂三	20	20
试剂四	2	2
试剂五	2	2
试剂六	2	2
样本	20	-
蒸馏水	-	20

充分混匀后于微量石英比色皿/96 孔 UV 板中测定 37℃条件下，340 nm 处初始值 A1 和 30 min 的吸光值 A2，分别记为 A1 测定管、A1 空白管、A2 测定管、A2 空白管。计算  $\Delta A = (A1 \text{ 测定管} - A2 \text{ 测定管}) - (A1 \text{ 空白管} - A2 \text{ 空白管})$ 。

**注：也可将试剂一、二、三、四、五、六按操作表比例，配制成工作液，现配现用；空白管只需做 1-2 次。**

### 三、焦磷酸：果糖-6-磷酸-1-磷酸转移酶活性的计算

1、按微量石英比色皿计算：

(1) 按照样本蛋白浓度计算

酶活单位定义：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。

$$\text{PFP (U/mg prot)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 53.59 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

(2) 按照样本质量计算

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

$$\text{PFP (U/g 质量)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{提取}}) \div T = 53.59 \times \Delta A \div W$$

(3) 按照细胞数量计算

酶活单位定义：每 10<sup>4</sup> 个细胞每分钟消耗 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{PFP (U / 10}^4 \text{ cell)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div (V_{\text{样}} \times \text{细胞数量} \div V_{\text{提取}}) \div T = 53.59 \times \Delta A \div \text{细胞数量}$$

(4) 按照液体体积计算

酶活单位定义：每毫升液体每分钟消耗 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{PFP (U/mL)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div V_{\text{样}} \div T = 53.59 \times \Delta A$$

V 反总: 反应体系总体积,  $2 \times 10^{-4} \text{L}$ ;  $\epsilon$ : NADH 摩尔消光系数,  $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$ ; d: 比色皿光径, 1 cm; V 样: 加入样本体积, 0.02 mL; V 提取: 加入提取液体积, 1 mL; T: 反应时间, 30 min; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量, g;  $10^9$ : 换算系数,  $1 \text{ mol} = 10^9 \text{ nmol}$ 。

2、按 96 孔 UV 板计算:

将上述公式中的  $d=1 \text{ cm}$  修改为  $d=0.6 \text{ cm}$  (96 孔 UV 板光径) 进行计算即可。

#### 注意事项:

1、每次检测样本数不宜太多以免耽误过多的酶促反应时间。

#### 实验实例:

1、取 0.1g 桃子进行样本处理, 取上清后按照测定步骤操作, 用微量石英比色皿测得计算 A1 测定管-A2 测定管  $=0.9984-0.9385=0.0599$ 、A1 空白管-A2 空白管  $=0$ 、 $\Delta A = (A1 \text{ 测定管}-A2 \text{ 测定管}) - (A1 \text{ 空白管}-A2 \text{ 空白管}) = 0.0599$ , 按照样本质量计算酶活得:

$\text{PFP (U/g 质量)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反总} \times 10^9 \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 提取}) \div T = 53.59 \times \Delta A \div W = 32.1 \text{ U/g 质量}$ 。