

## 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

分光光度法 50 管/48 样

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

### 测定意义：

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。

### 测定原理：

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 3-磷酸甘油醛，再由 3-磷酸甘油醛脱氢酶和 NADH 催化生成 3-磷酸甘油酸、NAD 和磷酸，340nm 处的吸光度变化反映了 PFP 的活性的高低。

### 组成：

产品名称	PSS016-50T/48S	Storage
提取液:液体	50ml	4°C
试剂一: 液体	30ml	4°C避光
试剂二: 粉剂	1 瓶	-20°C避光
试剂三: 粉剂	1 瓶	-20°C避光
试剂四: 液体	0.5ml	4°C避光
试剂五: 液体	0.5ml	4°C避光
试剂六: 液体	5ml	4°C避光
说明书	一份	

试剂二：粉剂×1 瓶，-20°C避光保存。临用前加 5ml 蒸馏水充分溶解；用不完的试剂分装后-20°C保存，禁止反复冻融。

试剂三：粉剂×1 瓶，-20°C避光保存。临用前加 5 ml 蒸馏水充分溶解；用不完的试剂分装后-20°C保存，禁止反复冻融。

试剂四：液体 0.5ml×1 瓶，4°C避光保存。

试剂五：液体 0.5ml×1 瓶，4°C避光保存。

试剂六：液体 5ml×1 瓶，4°C避光保存。

### 自备仪器和用品：

最终解释权所有 © 伊势久（江苏连云港）生物科技有限责任公司，保留一切权利



天平、低温离心机、研钵、紫外分光光度计、1 ml 石英比色皿。

### 酶液提取：

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 0.1g, 加入 1ml 提取液) 加入提取液, 冰浴匀浆后于 4°C, 10000g 离心 10min, 取上清置冰上待测。
2. 细胞：按照细胞数量 ( $10^4$  个) : 提取液体积 (ml) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 500 万细胞加入 1ml 提取液), 冰浴超声波破碎细胞 (功率 300w, 超声 3 秒, 间隔 7 秒, 总时间 3min); 然后 4°C, 10000g 离心 10min, 取上清置冰上待测。
3. 液体：直接检测。

### 测定步骤：

1. 分光光度计预热 30min, 调节波长至 340nm, 蒸馏水调零。
2. 取 1ml 石英比色皿, 依次加入 580 $\mu$ l 试剂一, 100 $\mu$ l 试剂二, 100 $\mu$ l 试剂三, 10 $\mu$ l 试剂四, 10 $\mu$ l 试剂五, 100 $\mu$ l 试剂六, 100 $\mu$ l 粗酶液, 充分混匀, 记录 340nm 处 10s 的吸光值 A1 和 310s 的吸光值 A2,  $\Delta A=A1-A2$

### 计算公式：

#### (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。

$$\text{PFP (nmol/min/mg prot)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 321.54 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

#### (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。

$$\text{PFP (nmol/min/g 鲜重)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 321.54 \times \Delta A \div W$$

#### (3) 按照细胞数量计算

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

$$\begin{aligned} \text{PFP (nmol/min/}10^4 \text{ cell)} &= \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{细胞数量} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 321.54 \times \Delta A \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

#### (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。

$$\text{PFP (nmol/min/ml)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T = 321.54 \times \Delta A$$

$V_{\text{反总}}$ : 反应体系总体积, 1ml;  $\epsilon$ : NADH 摩尔消光系数,  $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$ ;  $d$ : 比色皿光径, 1cm;

$V_{\text{样}}$ : 加入样本体积, 0.1ml;  $V_{\text{样总}}$ : 加入提取液体积, 1ml;  $T$ : 反应时间, 5 min;  $\text{Cpr}$ : 样本蛋白质浓度, mg/ml;  $W$ : 样本质量, g

