

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

紫外分光光度法

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：BC3400

规格：50T/48S

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，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 55 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 40 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	粉剂×1 瓶	-20℃保存
试剂三	粉剂×1 瓶	-20℃保存
试剂四	液体×2 支	2-8℃保存
试剂五	液体×2 支	-20℃保存
试剂六	液体 60 μL×1 支	2-8℃保存

溶液的配制：

- 1、试剂二：临用前加 6 mL 蒸馏水充分溶解；用不完的试剂分装后-20℃保存两周，禁止反复冻融。
- 2、试剂三：临用前加 6 mL 蒸馏水充分溶解；用不完的试剂分装后-20℃保存两周，禁止反复冻融。
- 3、试剂四：临用前取 1 支加入 0.3 mL 蒸馏水溶解备用，2-8℃保存一周。
- 4、试剂五：临用前取 1 支加入 0.3 mL 蒸馏水溶解备用，-20℃分装保存一周，禁止反复冻融。
- 5、试剂六：临用前加入 0.6 mL 蒸馏水溶解备用，2-8℃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。

需自备的仪器和用品：

紫外分光光度计、低温离心机、水浴锅/恒温培养箱、1 mL 石英比色皿、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℃, 20000 g 离心 15 min, 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 1 mL 提取液), 冰浴超声波破碎细胞 (功率 300 W, 超声 3 s, 间隔 7 s, 总时间 3 min); 然后 4℃, 20000 g 离心 15 min, 取上清置冰上待测;

3、液体: 直接检测。

二、测定步骤

1、紫外分光光度计预热 30 min 以上, 调节波长至 340 nm, 蒸馏水调零。

2、操作表:

试剂名称 (μL)	测定管	空白管
试剂一	670	670
试剂二	100	100
试剂三	100	100
试剂四	10	10
试剂五	10	10
试剂六	10	10
样本	100	-
蒸馏水	-	100

充分混匀于 1 mL 石英比色皿中测定 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。

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

(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。

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

(3) 按照细胞数量计算

酶活单位定义: 每 10^4 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, 0.001 L; ϵ : NADH 摩尔消光系数, $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$; d: 1 mL 石英比色皿光径, 1 cm; V 样: 加入样本体积, 0.1 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, $1 \text{ mol} = 10^9 \text{ nmol}$ 。

注意事项:



本产品仅供科学研究使用。请勿用于临床、诊断、食品、化妆品检测等用途。

For research use only. Do not use for clinical, diagnostic, food, cosmetic testing and other purposes.

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 豆芽进行样本处理，取上清后按照测定步骤操作，测得计算 A1 测定管-A2 测定管=1.041-0.963=0.078、A1 空白管-A2 空白管=0、 $\Delta A = (A1 \text{ 测定管}-A2 \text{ 测定管}) - (A1 \text{ 空白管}-A2 \text{ 空白管}) = 0.078$ ，按照样本质量计算酶活得：

$$\text{PFP (U/g 质量)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反总} \times 10^9 \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 提取}) \div T = 53.59 \times \Delta A \div W = 41.8 \text{ U/g 质量。}$$

相关系列产品：

BC0990/BC0995 植物叶绿素含量检测试剂盒

BC2210/BC2215 3-磷酸甘油醛脱氢酶（GAPDH）活性检测试剂盒

BC4330/BC4335 植物类胡萝卜素含量检测试剂盒

