



焦磷酸：果糖-6-磷酸-1-磷酸转移酶活性检测试剂盒

PFP Assay Kit

微量法

产品编号：AK510M

产品规格：100T/96S

产品组成及保存条件：

编号	规格	储存条件
ES510	100mL×1 瓶	4℃保存；
AK510-A	10mL×1 瓶	4℃避光保存；
AK510-B	粉剂×1 瓶	-20℃避光保存。临用前加 2mL 蒸馏水充分溶解；用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融。
AK510-C	粉剂×1 瓶	-20℃避光保存。临用前加 2mL 蒸馏水充分溶解；用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融。
AK510-D	1mL×1 瓶	4℃避光保存；
AK510-E	1mL×1 瓶	4℃避光保存；
AK510-F	2mL×1 瓶	4℃避光保存；

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介：

意义：焦磷酸：果糖-6-磷酸-1-磷酸转移酶(Pyrophosphate: fructose-6 – phosphate-1-phosphoric acid transferase, 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。

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。

自备用品：

紫外分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔板(UV 板)、天平、低温离心机、研钵、冰和蒸馏水。

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 ES510）加入提取液，冰浴匀浆后于 4℃，10000g 离心 10min，取上清置冰上待测。
2. 细胞：按照细胞数量 (10⁴ 个)：提取液体积 (mL) 为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细胞加入 1mL ES510），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℃，10000g 离心 10min，取上清置冰上待测。
3. 液体：直接检测。

测定步骤：

1. 紫外分光光度计/酶标仪预热 30min，调节波长至 340nm，蒸馏水调零。
2. 取微量石英比色皿/96 孔板，依次加入：

试剂名称	测定管(ul)
AK510-A	100
AK510-B	20
AK510-C	20
AK510-D	10

AK510-E	10
AK510-F	20
粗酶液	20
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：

a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

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。

$$PFP (U/mg \text{ prot}) = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 321.54 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

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。

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

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。

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

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。

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

注： $V_{\text{反总}}$ ：反应体系总体积，0.2mL； ϵ ：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，0.02mL； $V_{\text{样总}}$ ：加入提取液体积，1mL； T ：反应时间，5 min； C_{pr} ：样本蛋白质浓度，mg/mL； W ：样本质量，g。

b. 用 96 孔板测定的计算公式如下

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。

$$PFP (U/mg \text{ prot}) = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 643.08 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

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。

$$PFP (U/g \text{ 鲜重}) = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 643.08 \times \Delta A \div W$$

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。

$$PFP (U/10^4 \text{ cell}) = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{细胞数量} \div V_{\text{样总}}) \div T = 643.08 \times \Delta A \div \text{细胞数量}$$

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。

$$PFP (U / mL) = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T = 643.08 \times \Delta A$$

注： $V_{\text{反总}}$ ：反应体系总体积，0.2mL； ϵ ：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，0.02mL； $V_{\text{样总}}$ ：加入提取液体积，1mL； T ：反应时间，5 min； C_{pr} ：样本蛋白质浓度，mg/mL； W ：样本质量，g。