

焦磷酸：果糖-6-磷酸-1-磷酸转移酶（PFP）试剂盒说明书

（货号：ADS-W-GH007 微板法 96 样 有效期：3 个月）

一、指标介绍：

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：

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 120mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉剂 2 瓶	-20℃保存	每瓶： 1. 开盖前注意使粉体落入底部（可手动甩一甩）； 2. 加入 3.1mL 的蒸馏水，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 1 瓶	-20℃保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部（可手动甩一甩）； 2. 加入 6.1mL 的蒸馏水溶解； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂三	液体 2.2mL×1 瓶	4℃避光保存	

三、实验器材：

研钵（匀浆机）、冰盒（制冰机）、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅（烘箱、培养箱、金属浴）、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

四、指标测定：

建议先选取 1-3 个差异大的样本（例如不同类型或分组）进行预实验，熟悉操作流程，根据预实验结果确定或调整样本浓度，以防造成样本或试剂不必要的浪费！

1、样本提取：

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、检测步骤：

- 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℃）。
- ③ 依次在 96 孔板中加入：

试剂组分（μL）	测定管
样本	20
提取液	60
试剂一	60
试剂二	60

试剂三	20
混匀，室温（25℃）条件下，10s 时于 340nm 处读取吸光值 A1，20min 后读取吸光值 A2， $\Delta A=A1-A2$ 。	

- 【注】1. 若 ΔA 的值在零附近，可以适当延长反应时间到 30min 或更长读取 A2，改变后的反应时间需代入计算公式重新计算。或适当加大样本量，则改变后的加样体积 V1 需代入计算公式重新计算。
2. 若起始值 A1 太大如超过 2（如颜色较深的植物叶片，一般色素较高，则起始值相对会偏高），可以适当减少样本加样量，则改变后的加样体积需代入计算公式重新计算。
或向待测样本中加少许活性炭混匀静置 5min 后 12000rpm, 4℃离心 10min，上清液用于检测；
3. 若 ΔA 的值大于 0.5，则需减少反应时间（如减少至 5min），则改变后的反应时间 T 需代入计算公式重新计算。
4. 若下降趋势不稳定，可以每隔 10S 读取一次吸光值，选取一段线性下降的时间段来参与计算，相对应的 A 值也代入计算公式重新计算。

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。

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

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。

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

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