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

注　意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

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。

自备实验用品及仪器：

天平、低温离心机、研钵、紫外分光光度计、1 mL 石英比色皿。

试剂组成和配制：

提取液：液体 50mL×1 瓶，4℃保存。

试剂一：液体 30mL×1 瓶，4℃避光保存。

试剂二：粉剂×1 瓶，-20℃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℃保存，禁止反复冻融。

试剂三：粉剂×1 瓶，-20℃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℃保存，禁止反复冻融。

试剂四：液体 0.5mL×1 瓶，4℃避光保存。

试剂五：液体 0.5mL×1 瓶，4℃避光保存。

试剂六：液体 5mL×1 瓶，4℃避光保存。

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℃，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℃，10000g 离心 10min，取上清置冰上待测。
3. 液体：直接检测。

测定操作：

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 580μL 试剂一，100μL 试剂二，100μL 试剂三，10μL 试剂四，10μL 试剂

五，100μL 试剂六，100μL 粗酶液，充分混匀，记录 340nm 处 10s 的吸光值 A1 和 310s 的吸光值 A2，

△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。

PFP（nmol/min/mg prot）=ΔA÷（ε×d）×V 反总÷(V 样×Cpr) ÷T=321.54×ΔA÷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。

PFP（nmol/min /g 鲜重）=ΔA÷（ε×d）×V 反总÷(W ×V 样÷V 样总) ÷T=321.54×ΔA÷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（nmol/min /10^4 cell）= ΔA÷（ε×d）×V 反总÷(V 样×细胞数量÷V 样总) ÷T

=321.54×ΔA÷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（nmol/min /mL）=ΔA÷（ε×d）×V 反总÷V 样÷T=321.54×ΔA

V 反总：反应体系总体积，1mL；ε：NADH 摩尔消光系数，6.22×10^3 L / mol /cm；d：比色皿光径，1cm；V 样：加入样本体积，0.1mL；V 样总：加入提取液体积，1mL；T：反应时间，5 min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g