

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 (10⁴ 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， $\Delta A = A1 - A2$

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。

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

(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。

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

(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； 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，0.1mL； $V_{\text{样总}}$ ：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