

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,
-

$$\Delta A = A1 - A2$$

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。

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

(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。

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

(3) 按照细胞数量计算

酶活单位定义: 每 10⁴ 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 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 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
