

焦磷酸：果糖-6-磷酸-1-磷酸转移酶（PFK）检测试剂盒 （紫外分光光度法）

产品货号：BA1166

产品规格：50管/48样

产品简介：

焦磷酸：果糖-6-磷酸-1-磷酸转移酶（PFK，EC2.7.1.90）是一种胞质酶，广泛存在于植物组织中，与磷酸果糖激酶一样催化果糖-6-磷酸的磷酸化，单PEP催化反应为可逆反应，并以焦磷酸代替ATP，在光合作用碳代谢中起重要作用。

PFK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磷酸二羟丙酮，再由 α -磷酸甘油脱氢酶和NADH催化生成3-二磷酸甘油和NAD，340nm处的吸光度变化反映了PFK的活性的高低。

注意：实验之前建议选择2-3个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

产品内容：

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体55mL×1瓶	2-8℃
试剂一	液体40mL×1瓶	2-8℃
试剂二	粉剂×1瓶	-20℃
试剂三	粉剂×1瓶	-20℃
试剂四	粉剂×2支	2-8℃
试剂五	粉剂×1支	-20℃
试剂六	液体20 μ L×1支	2-8℃

溶液的配制：

1. 试剂二：临用前加6mL蒸馏水充分溶解；用不完的试剂分装后-20℃保存两周，禁止反复冻融。
2. 试剂三：临用前加6mL蒸馏水充分溶解；用不完的试剂分装后-20℃保存两周，禁止反复冻融。
3. 试剂四：临用前取1支加入0.3mL蒸馏水溶解，4℃保存一周。
4. 试剂五：临用前取1支加入0.3mL蒸馏水溶解，-20℃分装保存两周，禁止反复冻融。
5. 试剂六：临用前加入0.6mL蒸馏水溶解，4℃保存一周，也可按比例现用现配。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计、低温离心机、水浴锅/恒温培养箱、1mL石英比色皿、可调式移液枪、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水、EP管。

操作步骤：

一、样品处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

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℃，20000g离心15min，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3s，间隔7s，总时间3min）；然后4℃，20000g离心15min，取上清



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

QQ：807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com

置冰上待测；

3. 液体：直接检测。

二、测定操作

1. 分光光度计预热30min以上，调节波长至340nm，蒸馏水调零。

2. 操作表：

试剂名称 (μL)	测定管	空白管
试剂一	670	670
试剂二	100	100
试剂三	100	100
试剂四	10	10
试剂五	10	10
试剂六	10	10
样本	100	-
蒸馏水	-	100

充分混匀于1mL石英比色皿中测定37℃条件下，340nm处初始值A1和30min的吸光值A2，分别记为A1测定管、A1空白管、A2测定管，A2空白管。计算 $\Delta A = (A1 \text{测定管} - A2 \text{测定管}) - (A1 \text{空白管} - A2 \text{空白管})$ 。

注：也可将试剂一、二、三、四、五、六按操作表比例，配制成工作液，现配现用；空白管只需做1-2次。

三、焦磷酸：果糖-6-磷酸-1-磷酸转移酶活性的计算

(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1nmol的NADH定义为一个酶活力单位。

$$\text{PFP (U/mg prot)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 53.59 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(2) 按照样本质量计算

酶活单位定义：每克组织每分钟消耗1nmol的NADH定义为一个酶活力单位。

$$\text{PFP (U/g 质量)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{提取}}) \div T = 53.59 \times \Delta A \div W$$

(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1nmol的NADH定义为一个酶活力单位。

$$\text{PFP (U/} 10^4 \text{cell)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div (V_{\text{样}} \times \text{细胞数量} \div V_{\text{提取}}) \div T = 53.59 \times \Delta A \div \text{细胞数量}$$

(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1nmol的NADH定义为一个酶活力单位。

$$\text{PFP (U/mL)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div V_{\text{样}} \div T = 53.59 \times \Delta A$$

V反总：反应体系总体积，0.001L； 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提取：加入提取液体积，1mL；T：反应时间，30min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g； 10^9 ：换算系数， $1 \text{mol} = 10^9 \text{nmol}$ 。

注意事项： 每次检测样本数不宜太多以免耽误过多的酶促反应时间。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

QQ: 807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com