

焦磷酸：果糖-6-磷酸-1-磷酸转移酶（PFK）检测试剂盒 （UV板，微量法）

产品货号：BA1167

产品规格：100管/96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110mL×1瓶	2-8℃
试剂一	液体15mL×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30 μ L×1支	2-8℃

溶液的配制：

1. 试剂二：临用前加2.5mL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2.5mL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。（1支粉剂溶解后可做100T，为了延长使用时间，此产品多给1支粉剂）
4. 试剂五：临用前加入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0.3mL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/酶标仪、低温离心机、水浴锅/恒温培养箱、微量石英比色皿/96孔UV板、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），



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

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，取上清置冰上待测；

3. 液体：直接检测。

二、测定操作

1. 分光光度计/酶标仪预热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	134	134
试剂二	20	20
试剂三	20	20
试剂四	2	2
试剂五	2	2
试剂六	2	2
样本	20	-
蒸馏水	-	20

充分混匀后于微量石英比色皿/96孔UV板中测定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. 按微量石英比色皿计算：

(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， $2 \times 10^{-4}\text{L}$ ； 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，0.02mL；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， $1\text{mol} = 10^9\text{nmol}$ 。

2. 按96孔UV板计算：

将上述公式中的d=1cm修改为d=0.6cm（96孔UV板光径）进行计算即可。

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