

果糖-1,6-二磷酸酶(Fructose 1,6-bisphosphatase, FBP)试剂盒说明书

分光光度法 50 管 48 样

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义:

果糖-1,6 二磷酸酶又称果糖 1,6 二磷酸酯酶, 催化 1,6 二磷酸果糖和水生成 6 磷酸果糖和无机磷, 在糖的异生代谢和光合作用同化物蔗糖的合成中起关键性的作用。

测定原理:

FBP 催化 1,6 二磷酸果糖和水生成 6 磷酸果糖和无机磷, 在反应体系中添加的磷酸葡萄糖异构酶和 6-磷酸葡萄糖脱氢酶依次催化生成 6-磷酸葡萄糖酸和 NADPH, 340nm 下测定 NADPH 增加速率, 即可计算 FBP 活性。

组成:

产品名称	PSS002-50T/48S	Storage
提取液一: 液体	50ml	4°C
提取液二: 液体	50ml	4°C
试剂一: 粉剂	1 瓶	-20°C
试剂二: 液体	18 μ l	4°C
试剂三: 粉剂	1 瓶	-20°C
试剂四: 液体	50ml	4°C
说明书	一份	

试剂一: 粉剂 \times 1 瓶, -20°C 保存; 临用前加入 40ml 试剂四充分溶解待用, 用不完的试剂 4°C 保存;
试剂二: 液体 18 μ l \times 1 瓶, 4°C 保存; 临用前加入 2.5ml 蒸馏水充分溶解待用, 用不完的试剂 4°C 保存;
试剂三: 粉剂 \times 1 瓶, -20°C 保存; 临用前加入 2.5ml 蒸馏水充分溶解待用, 用不完的试剂 4°C 保存;

自备仪器和用品:

分光光度计、恒温水浴锅、台式离心机、可调式移液器、1 ml 石英比色皿、研钵、冰和蒸馏水

样本的前处理:

①总 FBP 酶提取: 建议称取约 0.1g 样本, 加入 1ml 提取液一, 冰浴匀浆后超声破碎 (冰浴, 200W, 破碎 3s, 间歇 7s, 总时间 1min), 然后 4°C, 8000g 离心 10min, 取上清测定。

最终解释权所有 © 伊势久 (江苏连云港) 生物科技有限责任公司, 保留一切权利



②胞浆和叶绿体 FBP 酶的分离：按照植物组织质量 (g) : 提取液体积(ml)为 1: 5 ~ 10 的比例 (建议称取约 0.1g 样本, 加入 1ml 提取液一), 冰浴匀浆后于 4℃, 200g 离心 5min, 弃沉淀, 取上清在 4℃, 8000g 离心 10min, 取上清用于测定胞浆 FBP 酶活性, 取沉淀加 1ml 提取液二, 震荡溶解后超声破碎 (冰浴, 200W, 破碎 3s, 间歇 7s, 总时间 1min), 然后 4℃, 8000g 离心 10min, 取上清测定叶绿体中 FBP 酶活性。建议测定总 FBP 酶活性, 按照步骤①提取粗酶液, 若需要分别测定胞浆和叶绿体中的 FBP, 则按照步骤②提取粗酶液。

测定步骤:

- 1、分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 340nm, 蒸馏水调零。
- 2、将试剂一、二、三 37℃(哺乳动物)或 25℃(其它物种)预热 10 分钟
- 3、加样表:

试剂名称 (μl)	测定管
样本	100
试剂二	50
试剂三	50
试剂一	800

将上述试剂按顺序加入 1 ml 石英比色皿中, 立即混匀, 加入最后一个试剂的同时开始计时, 在 340 nm 波长下记录反应 1min 后吸光度 A1 和反应 6min 后的吸光度 A2, 计算 $\Delta A=A_2-A_1$ 。

FBP 活性计算:

(1) 按样本蛋白浓度计算

单位的定义: 每 mg 组织蛋白每分钟生成 1 nmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{FBP (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 321.5 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

(2) 按样本鲜重计算

单位的定义: 每 g 组织每分钟生成 1 nmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{FBP (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 321.5 \times \Delta A \div W$$

V 反总: 反应体系总体积, 1×10^{-3} L; ϵ : NADPH 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, 0.1 ml; 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。

