

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

微量法 100 管/96 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	PSS003-100T/96S	Storage
提取液：液体	100ml	4°C
提取液：液体	100ml	4°C
试剂一：粉剂	1 瓶	-20°C
试剂二：液体	7.2 μ l	4°C
试剂三：粉剂	1 瓶	-20°C
试剂四：液体	25ml	4°C
说明书	一份	

试剂一：粉剂 \times 1 瓶，-20°C 保存；临用前加入 20ml 试剂四充分溶解待用，用不完的试剂 4°C 保存；

试剂二：液体 7.2 μ l \times 1 支，4°C 保存；临用前加入 1ml 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 支，-20°C 保存；临用前加入 1ml 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/酶标仪、恒温水浴锅、台式离心机、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔板、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



伊势久(江苏连云港)生物科技有限责任公司

江苏省连云港市海州区花果山大道 17 号



服务热线：0518-81263339

官网：<http://www.bio149.com>

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°C, 200g 离心 5min, 弃沉淀, 取上清在 4°C, 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°C, 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°C(哺乳动物)或 25°C(其它物种)预热 10 分钟
- 3、加样表:

试剂名称(μl)	测定管
样本	20
试剂二	10
试剂三	10
试剂一	160

将上述试剂按顺序加入微量石英比色皿或 96 孔板中, 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 $\Delta A = A2 - A1$ 。

FBP 活性计算:

a.用微量石英比色皿测定的计算公式如下

(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。

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

(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。

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

 $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, 2×10^{-4} L; ϵ : NADPH 摩尔消光系数, 6.22×10^3 L / mol / cm; d : 比色皿光径, 1cm; $V_{\text{样}}$: 加入样本体积, 0.02 ml; $V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积, 1 ml; T : 反应时间, 5 min; C_{pr} : 样本蛋白质浓度, mg/ml; W : 样本质量, g。

b.用 96 孔板测定的计算公式如下

(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。

$$FBP \text{ (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 643 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

(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。

$$FBP \text{ (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 643 \times \Delta A \div W$$



V 反总: 反应体系总体积, 2×10^{-4} L; ϵ : NADPH 摩尔消光系数, 6.22×10^3 L / mol / cm; d: 96 孔板光径, 0.5cm; V 样: 加入样本体积, 0.02ml; V 样总: 加入提取液体积, 1 ml; T: 反应时间, 5 min; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/ml; W: 样本质量, g。

