

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

注 意：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。

需自备的仪器和用品：

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。

试剂的组成和配制：

提取液一：液体 100mL×1 瓶，4℃ 保存。

提取液二：液体 100mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂一：粉剂×1 瓶，-20℃ 保存；临用前加入 20mL 试剂四充分溶解待用，用不完的试剂 4℃ 保存；

试剂二：液体 7.2μL×1 支，4℃ 保存；临用前加入 1mL 蒸馏水充分溶解待用，用不完的试剂 4℃ 保存；

试剂三：粉剂×1 支，-20℃ 保存；临用前加入 1mL 蒸馏水充分溶解待用，用不完的试剂 4℃ 保存；

试剂四：液体 25mL×1 瓶，4℃ 保存；

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℃，8000g 离心 10min，取上清测定。

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、 分光光度计或酶标仪预热 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	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 $\Delta A = A_2 - A_1$ 。

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。

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

(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， 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 样：加入样本体积，0.02 mL；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。

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。

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

(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。

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

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。