

果糖-1,6-二磷酸（酯）酶(Fructose 1,6-bisphosphatase, FBP)

试剂盒说明书

(货号: G0823F 分光法 48 样)

一、产品简介:

果糖-1,6-二磷酸酶又称果糖 1,6-二磷酸酯酶 (FBP, EC 3.1.3.11), 是糖异生途径中的关键酶, 不同糖异生底物在多种酶的作用下转化为 1,6-二磷酸果糖, 之后在 FBP 催化下水解为 6-磷酸果糖和无机磷, 该酶的异常表达与某些疾病有密切关系。

本试剂盒提供一种简单, 灵敏, 快速的测定方法: FBP 催化 1,6-二磷酸果糖和水生成 6-磷酸果糖和无机磷, 与酶促复合物相互作用, 该过程中产生的 NADPH 紧接着与特异的显色探针反应生成有色物质, 通过检测该有色物质的增加速率, 进而计算出 FBP 酶活性大小。

二、试剂盒的组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 60mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂一	粉剂 mg×1 支	4°C 保存	使用前甩几下或离心使试剂落入底部, 再加 2.1mL 蒸馏水溶解备用。
试剂二	粉剂 mg×1 支	-20°C 保存	使用前甩几下或离心使试剂落入底部, 再加 2.1mL 蒸馏水溶解备用。
试剂三	液体 2mL×1 支	4°C 保存	
试剂四	液体 30mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂五	粉剂 mg×1 瓶	4°C 保存	使用前甩几下或离心使试剂落入底部, 再加 4.2mL 蒸馏水溶解备用。
标准品	粉剂 mg×1 支	4°C 保存	若重新做标曲, 则用到该试剂

三、所需的仪器和用品:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm)、恒温水浴锅、台式离心机、可调式移液器、研钵和蒸馏水。

四、果糖-1,6-二磷酸（酯）酶(FBP)活性检测:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

1、样本制备:

① 组织样本:

称取约 0.1g 样本, 加入 1mL 提取液进行冰浴匀浆, 于 4°C, 12000rpm 离心 10min, 取上清液测定。

【注】: 若增加样本量, 可按照组织质量 (g): 提取液体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例进行提取。

② 细菌/细胞样本:

先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 取 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液, 在 4°C 或冰浴进行匀浆 (或使用各类常见电动匀浆器)。4°C 约 12,000rpm 离心 10min, 取上清待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照细菌/细胞数量 (10^4): 提取液 (mL) 为 500~1000: 1 的比例进行提取。

2、上机检测:

① 可见分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 450nm, 设置温度 25°C, 蒸馏水调零。

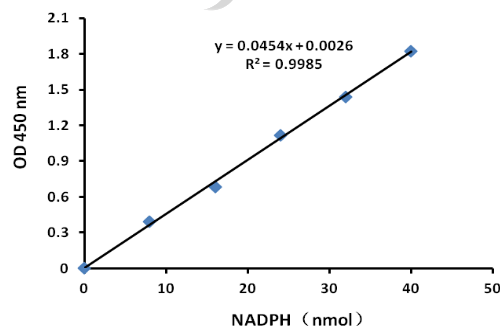
② 试剂解冻至室温 (25°C)。

③ 在 1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm) 中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管
样本	40
试剂一	40
试剂二	40
试剂三	40
试剂四	500
轻轻混匀, 室温 (25°C) 孵育 10min	
试剂五	80
混匀, 于 450nm 处测定, 1min 时读取 A1, 15min 后读取 A2, ΔA=A2-A1。	

五、结果计算:

1、标准曲线方程: $y = 0.0454x + 0.0026$, x 是标准品摩尔质量 (nmol), y 是 ΔA 。



2、按样本蛋白浓度计算:

酶活定义: 每毫克组织蛋白每分钟催化产生 1nmol NADPH 定义为一个酶活性单位。

$$FBP(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [(\Delta A - 0.0026) \div 0.0454] \div (V1 \times Cpr) \div T = 36.7 \times (\Delta A - 0.0026) \div Cpr$$

3、按照样本鲜重计算:

酶活定义: 每克组织每分钟催化产生 1nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$FBP(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [(\Delta A - 0.0026) \div 0.0454] \div (W \times V1 \div V) \div T = 36.7 \times (\Delta A - 0.0026) \div W$$

4、按细胞数量计算:

酶活定义: 每 10^4 个细胞每分钟催化产生 1nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$FBP(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A - 0.0026) \div 0.0454] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 36.7 \times (\Delta A - 0.0026) \div 500$$

V---加入提取液体积, 1mL; V1---加入样本体积, 0.04mL;

T---反应时间, 15min; W---样本质量, g; 500---细胞数量, 万;

Cpr---样本蛋白质浓度, mg/mL; 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。

附: 标准曲线制作过程:

- 1 制备标准品母液 (1nmol/μL): 向标准品 EP 管里面加入 0.6mL 蒸馏水 (母液需在两天内用且-20°C 保存)。
- 2 把母液稀释成六个浓度梯度的标准品: 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1. nmol/μL。
- 3 40μL 标准品+40μL 试剂三+160μL 蒸馏水+500μL 试剂四, 450nm 读取吸光值 A。根据结果即可制作标准曲线。