



果糖-1,6-二磷酸酯酶活性检测试剂盒

FBP Assay Kit

微量法

产品编号: AK504M

产品规格: 100T/96

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
ES504-1	100mL×1 瓶	4℃保存；
ES504-2	100mL×1 瓶	4℃保存；
AK504-A	粉剂×1 瓶	-20℃保存；临用前加入 20mL AK504-D 充分溶解待用，用不完的试剂 4℃保存；
AK504-B	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；
AK504-C	粉剂×1 瓶	-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；
AK504-D	25mL×1 瓶	4℃保存；

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介:

意义: 果糖-1,6 二磷酸酶 (Fructose 1,6-bisphosphatase, FBP) 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。

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。

自备用品:

分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔板 (UV 板) 、恒温水浴锅、台式离心机、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

样本的前处理:

- 总 FBP 酶提取:** 建议称取约 0.1g 样本，加入 1mL ES504-1，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。
- 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 ES504-1)，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 ES504-2，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:

- 分光光度计/酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 340nm，蒸馏水调零。
- 将 AK504-A、B、C 置 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其它物种) 预热 10 分钟。
- 操作表 (在微量石英比色皿或 96 孔板中依次加入)

试剂名称	测定管 (ul)	空白管 (ul)
样本	20	
提取液		20

AK504-B	10	10
AK504-C	10	10
AK504-A	160	160
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 ΔA 测定 = A_2 测定 - A_1 测定， ΔA 空白 = A_2 空白 - A_1 空白， $\Delta A = \Delta A$ 测定管 - ΔA 空白管。		

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。

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

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。

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

注： $V_{\text{反总}}$ ：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； $V_{\text{总}}$ ：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。

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

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。

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

注： $V_{\text{反总}}$ ：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 ：96 孔板光径，0.5cm； $V_{\text{样}}$ ：加入样本体积，0.02mL； $V_{\text{总}}$ ：加入提取液体积，1 mL； T ：反应时间，5 min； C_{pr} ：样本蛋白浓度，mg/mL； W ：样本质量，g。