

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。

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。

$$\text{FBP (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 321.5 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(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。

$$\text{FBP (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 321.5 \times \Delta A \div W$$

V反总：反应体系总体积， $2 \times 10^{-4}$  L； $\epsilon$ ：NADPH摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3$  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。

$$\text{FBP (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 643 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(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。

$$\text{FBP (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 643 \times \Delta A \div W$$

V反总：反应体系总体积， $2 \times 10^{-4}$  L； $\epsilon$ ：NADPH摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3$  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。