

植物果糖-1,6-二磷酸(酯)酶(FBP)试剂盒说明书

(货号: ADS-F-TYS003-48 紫外分光法 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), 有两种 FBPase 存在于光合细胞中。胞质型 FBP 主要存在于细胞质, 参与蔗糖合成和糖异生途径; 叶绿体型 FBP 存在于叶绿体中, 它在二氧化碳同化途径中发挥调节作用。

FBP 催化 1,6-二磷酸果糖和水生成 6-磷酸果糖和无机磷, 接着与酶促复合物相互作用, 伴随着 NADPH 的生成, 通过检测 NADPH 在 340nm 处的增加速率, 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
提取液一	液体 60mL×1 瓶	4℃ 保存	
提取液二	液体 60mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	粉剂 1 支	4℃ 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 1 支	-20℃ 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 30mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂四	粉剂 1 瓶	4℃ 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。

三、所需的仪器和用品:

紫外分光光度计、1mL 石英比色皿(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 总 FBP 酶提取: 建议称取约 0.1g 样本, 加入 1mL 提取液二进行冰浴匀浆, 于 4℃, 13000rpm 离心 5min, 取上清液测定。

② 胞浆和叶绿体 FBP 酶分离:

称取约 0.2g 样本, 加入 1mL 提取液一, 快速冰浴匀浆后于 4℃, 1600rpm 离心 5min, 弃沉淀, 取上清再 4℃, 5000rpm 离心 15min, 取上清用于测定胞浆 FBP 酶活性, 取沉淀加 1mL 提取液二, 强力涡旋震荡 15s, 置于冰上(或冰箱)孵育 15min, 在 4℃, 13000rpm 离心 5min, 取上清测定叶绿体中 FBP 酶活性。提示: 整个叶绿体的提取过程须保持 4℃ 低温环境。

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。

【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、上机检测:

- ① 紫外分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 340nm, 设置温度 25℃, 蒸馏水调零。
- ② 试剂解冻至室温(25℃)。
- ③ 在 1mL 石英比色皿中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管
样本	40
试剂一	40
试剂二	40
试剂三	500
轻轻混匀，室温（25℃）孵育 10min	
试剂四	80
混匀，于340nm 处测定，1min 时读取A1，10min 后读取A2， $\Delta A = A2 - A1$ 。	

【注】若 ΔA 在零附近徘徊，可以延长至20min 后重新读取A2，或则增加样本量V1（如增至80μL，则试剂三相应减少），则改变后的反应时间T 或样本量V1 需重新代入公式计算。

五、结果计算：

1、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。

$$\text{FBP}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T$$

$$= 281.4 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

2、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。

$$\text{FBP}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (W \times V1 \div V) \div T$$

$$= 281.4 \times \Delta A \div W$$

V---加入提取液体积，1 mL；

V2---反应体系总体积， 7×10^{-4} L；

ϵ ---NADPH 摩尔消光系数， 6.22×10^3 L / mol /cm；

W---样本质量，g；

Cpr---蛋白浓度 (mg/mL)，建议使用本公司的 BCA 蛋白含量测定试剂盒。

V1---加入样本体积，0.04mL；

d---光径，1cm；

T---反应时间，10min；

。