

## 果糖-1,6-二磷酸（酯）酶(Fructose 1,6-bisphosphatase, FBP) 试剂盒说明书

（货号：ADS-W-TYS003-96 微板法 96 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 100mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	粉剂 1 支	4°C保存	用前甩几下或离心使试剂落入底部，再加 1.1mL 蒸馏水溶解备用。
试剂二	粉剂 1 支	-20°C保存	用前甩几下或离心使试剂落入底部，再加 1.1mL 蒸馏水溶解备用，溶解好的试剂可-20°C分装冻存。
试剂三	液体 1mL×1 支	4°C保存	
试剂四	液体 20mL×1 瓶	4°C保存	
试剂五	粉剂 1 支	4°C保存	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。
标准品	粉剂 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：

酶标仪、96 孔板、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 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 450nm，设置温度 25°C。

② 试剂解冻至室温（25°C）或水浴锅（25°C）孵育 15-30min。

③ 在 96 孔板中依次加入：

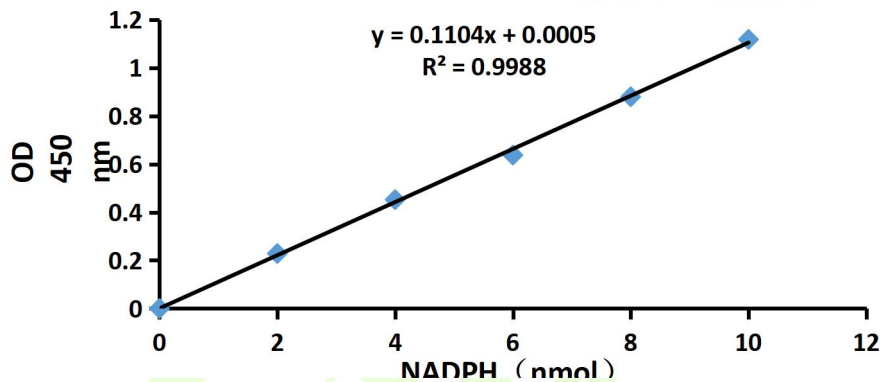
试剂名称（ $\mu$ L）	测定管
样本	10

试剂一	10
试剂二	10
试剂三	10
试剂四	140
轻轻混匀, 室温 (25°C) 孵育 5min	
试剂五	20
混匀, 于 450nm 处测定, 1min 时读取 A1, 15min 后读取 A2, $\Delta A=A2-A1$ 。	

【注】若 $\Delta A$  小于 0.01, 可延长反应时间 T (如增至 25min 后重新读取 A2), 或增加 V1 (如增至 50 $\mu$ L, 则试剂四相应减少), 则改变后的 T 和 V1 需重新代入公式计算。

## 五、结果计算:

1、标准曲线方程:  $y = 0.1104x + 0.0005$ , x 是标准品摩尔质量 (nmol), y 是 $\Delta A$ 。



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。

$$FBP(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [(\Delta A - 0.0005) \div 0.1104] \div (V1 \times Cpr) \div T = 60.4 \times (\Delta A - 0.0005) \div Cpr$$

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。

$$FBP(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [(\Delta A - 0.0005) \div 0.1104] \div (W \times V1 \div V) \div T = 60.4 \times (\Delta A - 0.0005) \div W$$

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。

$$FBP(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A - 0.0005) \div 0.1104] \div (W \times V1 \div V) \div T = 60.4 \times (\Delta A - 0.0005) \div 500$$

V---加入提取液体积, 1mL;

V1---加入样本体积, 0.01mL;

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/ $\mu$ L): 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 把母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品: 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1. nmol/ $\mu$ L。
- 3 10 $\mu$ L 标准品+10 $\mu$ L 试剂三+40 $\mu$ L 蒸馏水+140 $\mu$ L 试剂四, 450nm 读取吸光值 A。根据结果即可制作标准曲线。