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

试剂盒说明书

（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℃保存	
试剂一	粉剂 mg×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 mg×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 2mL×1 支	4℃保存	
试剂四	液体 30mL×1 瓶	4℃保存	
试剂五	粉剂 mg×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。
标准品	粉剂 mg×1 支	4℃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℃，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℃ 或冰浴进行匀浆（或使用各类常见电动匀浆器）。4℃ 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℃，蒸馏水调零。

② 试剂解冻至室温（25℃）。

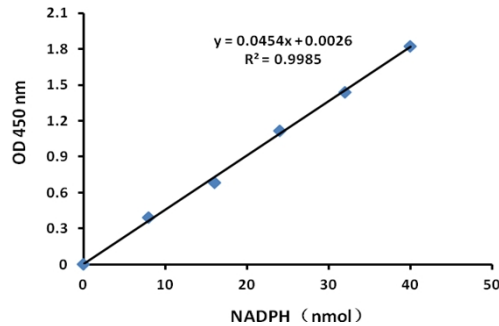
③ 在 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中依次加入：

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。	

【注】若 ΔA 小于 0.01, 可以延长反应时间 T (如增至 25min 后重新读取 A2), 或增加 V1 (如增至 100μL, 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: $y = 0.0454x + 0.0026$, 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。

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

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。

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

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。

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

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。