

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

(货号: G0823W 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 mg×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 mg×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。
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 mg×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 mg×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:

称取约 0.1g 样本, 加入 1mL 提取液二进行冰浴匀浆, 于 4°C, 13000rpm 离心 5min, 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、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)。
- ③ 在 96 孔板中依次加入:

试剂名称 (μL)	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	

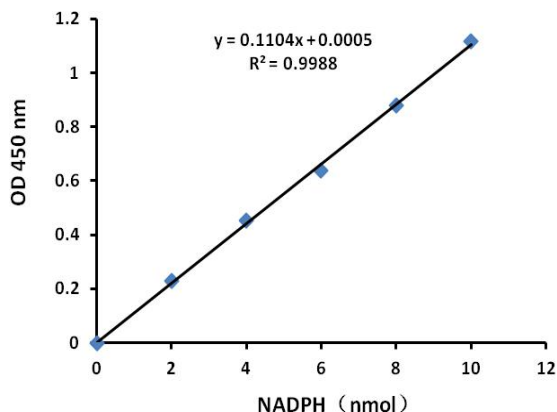
试剂五	20
混匀, 于 450nm 处测定, 1min 时读取 A1, 15min 后读取 A2, $\Delta A=A2-A1$ 。	

【注】1.若 $\Delta A$  在零附近徘徊, 可以延长反应时间 T (如增至 25min 后重新读取 A2), 则改变后的反应时间 T 需重新代入计算公式计算。

2. 若样本含有高的背景值, 做测定管时候可以增设一个样本自身对照, 即 20 $\mu$ L 试剂五换成 20 $\mu$ L 蒸馏水, 其他试剂照加, 则 $\Delta A=\Delta A_{测定}-\Delta A_{对照}$ 。

## 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。

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

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。

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

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;

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 $^{\circ}$ 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/ $\mu$ L。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 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。