

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

试剂盒说明书

(货号: BP10195W 微板法 96 样 有效期: 3 个月)

一、指标介绍:

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:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 100mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉剂 1 支	4℃保存	1. 临用前 8000g 4 ° C 离心 2min 使试剂落入管底 (可手动甩一甩); 2. 加入 1.1mL 蒸馏水溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂二	粉剂 1 支	-20℃保存	1. 临用前 8000g 4 ° C 离心 2min 使试剂落入管底 (可手动甩一甩); 2. 加入 1.1mL 蒸馏水溶解备用; 3. 溶解好的试剂可-20℃分装冻存。
试剂三	液体 1mL×1 支	4℃避光保存	
试剂四	液体 20mL×1 瓶	4℃保存	
试剂五	粉剂 1 瓶	4℃保存	1. 开盖前注意使粉剂落入底部 (可手动甩一甩); 2. 加入 2.1mL 蒸馏水溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
标准品	粉剂 1 支	4℃保存	1. 若重新做标曲, 则用到该试剂; 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制; 3. 溶解后的标品一周内用完。

三、实验器材:

研钵 (匀浆机)、冰盒 (制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅 (烘箱、培养箱、金属浴)、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本 (例如不同类型或分组) 进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

1、样本提取:

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、检测步骤：

① 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 450nm，设置温度 25℃。

② 试剂解冻至室温（25℃）或水浴锅（25℃）孵育 15-30min。

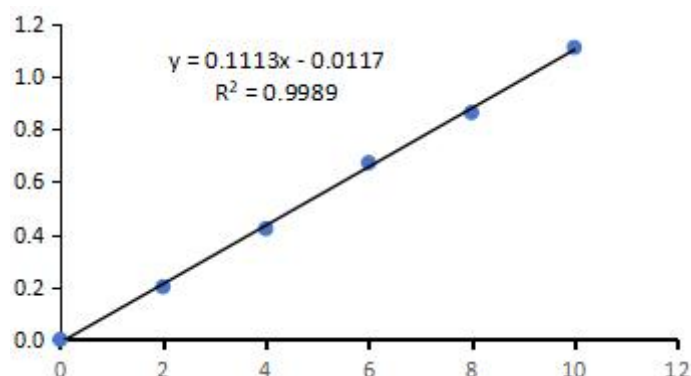
③ 在 96 孔板中依次加入：

试剂组分（ μ 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℃）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 ΔA 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 μ 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： $y = 0.1113x - 0.0117$ ，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。

$FBP(nmol/min/mg \text{ prot}) = [(\Delta A + 0.0117) \div 0.1113] \div (V1 \times Cpr) \div T = 59.9 \times (\Delta A + 0.0117) \div Cpr$

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。

$FBP(nmol/min/g \text{ 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0117) \div 0.1113] \div (W \times V1 \div V) \div T = 59.9 \times (\Delta A + 0.0117) \div W$

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。

$FBP(nmol/min/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0117) \div 0.1113] \div (W \times V1 \div V) \div T = 59.9 \times (\Delta A + 0.0117) \div 500$

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 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℃保存），标准品母液浓度为 1nmol/μL。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1 nmol/μL。也可根据实际样本调整标准品浓度。

- 2 标品稀释参照表如下：

标品浓度 nmol/μL	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1
标品稀释液 uL	0	40	80	120	160	200
水 uL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

- 3 依据加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。

试剂名称 (μL)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	10	
蒸馏水		10
试剂三	10	10
蒸馏水	40	40
试剂四	140	140
混匀，450nm 读取吸光值 A， $\Delta A = A$ 测定-0 浓度管。		