

上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0529

Size: 100T/96S

果糖-1, 6-二磷酸酶 (FBP) 检测试剂盒说明书

微量法

*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

一、测定意义:

果糖-1, 6-二磷酸酶又称果糖 1, 6-二磷酸酯酶, 催化 1, 6-二磷酸果糖和水生成 6-磷酸果糖和无机磷, 在糖的异生代谢和光合作用同化物蔗糖的合成中起关键性的作用。

二、测定原理:

FBP 催化 1, 6-二磷酸果糖和水生成 6-磷酸果糖和无机磷, 在反应体系中添加的磷酸葡萄糖异构酶 6-磷酸葡萄糖脱氢酶依次催化生成 6-磷酸葡萄糖酸和 NADPH, 340nm 下测定 NADPH 增加速率, 即可计算 FBP 活性。

三、需自备的仪器和用品:

分光光度计/酶标仪、恒温水浴锅、台式离心机、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔板 (UV 板)、研钵、冰和蒸馏水。

四、试剂的组成和配置:

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液	100mL × 1 瓶	4°C 保存	
试剂一	粉剂 × 1 瓶	-20°C 保存	临用前加入 20mL 试剂四充分溶解待用, 用不完的试剂 4°C 保存;
试剂二	液体 × 1 支	4°C 保存	临用前加入 1mL 蒸馏水充分溶解待用, 用不完的试剂 4°C 保存
试剂三	粉剂 × 1 支	-20°C 保存	临用前加入 1mL 蒸馏水充分溶解待用, 用不完的试剂 4°C 保存
试剂四	液体 25mL × 1 瓶	4°C 保存	

五、样本的前处理

- 1、细菌或培养细胞：先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；按照细菌或细胞数量（ 10^4 个）：提取液体积（mL）为 500~1000: 1 的比例（建议 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液），超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 20%或 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；8000g 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。
- 2、组织：按照组织质量（g）：提取液体积（mL）为 1: 5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液），进行冰浴匀浆。8000g 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

六、测定步骤

- 1、分光光度计或酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 340nm，蒸馏水调零。
- 2、将试剂一、二、三 37℃(哺乳动物)或 25℃(其它物种)预热 10 分钟。
- 3、加样表：

试剂名称（ μ L）	测定管
样本	20
试剂二	10
试剂三	10
试剂一	160

将上述试剂按顺序加入微量石英比色皿或 96 孔板（UV 板）中，立即混匀，加入最后一个试剂的同时开始计时，在 340nm 波长下记录反应 1min 后吸光度 A1 和反应 6min 后的吸光度 A2，计算 $\Delta A=A_2-A_1$ 。

七、FBP 活性计算

- 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

(1) 按样本蛋白浓度计算

单位的定义：每 mg 组织蛋白每分钟生成 1nmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{FBP (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 321.5 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

(2) 按样本鲜重计算

单位的定义：每 g 组织每分钟生成 1nmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{FBP (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 321.5 \times \Delta A \div W$$

(3) 按细菌或细胞密度计算

单位的定义：每 1 万个细菌或细胞每分钟生成 1nmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{FBP (nmol/min/10}^4\text{cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.643 \times \Delta A$$

$V_{\text{反总}}$ ：反应体系总体积， 2×10^{-4} L； ϵ ：NADPH 摩尔消光系数， 6.22×10^3 L/mol/cm； d ：比色皿光径，1cm； $V_{\text{样}}$ ：加入样本体积，0.02mL； $V_{\text{样总}}$ ：加入提取液体积，1 mL； T ：反应时间，5 min； C_{pr} ：样本蛋白质浓度，mg/mL； W ：样本质量，g；500：细菌或细胞总数，500 万。

- 用 96 孔板 (UV 板) 测定的计算公式如下

(1) 按样本蛋白浓度计算

单位的定义：每 mg 组织蛋白每分钟生成 1nmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{FBP (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T$$

$$= 643 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(2) 按样本鲜重计算

单位的定义：每 g 组织每分钟生成 1nmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{FBP (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$

$$= 643 \times \Delta A \div W$$

(3) 按细菌或细胞密度计算

单位的定义：每 1 万个细菌或细胞每分钟生成 1nmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{FBP (nmol/min/10}^4\text{cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$

$$= 1.286 \times \Delta A$$

V_{反总}：反应体系总体积， 2×10^{-4} L； ϵ ：NADPH 摩尔消光系数， 6.22×10^3 L/mol/cm；
d：96 孔板光径，0.5cm；V_样：加入样本体积，0.02mL；V_{样总}：加入提取液体积，1 mL；
T：反应时间，5 min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；500：细菌或细胞总数，500 万。