

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-S0814

Size: 50T/48S

果糖-1,6-二磷酸酶(FBP)检测试剂盒说明书

紫外分光光度法

*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和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、恒温水浴锅、台式离心机、可调式移液器、1 mL 石英比色皿、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	60mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉剂×1 瓶	-20℃保存	临用前加入 40mL 试剂四充分溶解待用, 用不完的试剂 4℃保存
试剂二	液体×1 瓶	4℃保存	临用前加入 2.5mL 蒸馏水充分溶解待用, 用不完的试剂 4℃保存
试剂三	粉剂×1 瓶	-20℃保存	临用前加入 2.5mL 蒸馏水充分溶解待用, 用不完的试剂 4℃保存
试剂四	液体 50mL×1 瓶	4℃保存	

五、操作步骤：

● 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。

● 测定步骤

- 1、分光光度计预热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	100
试剂二	50
试剂三	50
试剂一	800

将上述试剂按顺序加入1 mL石英比色皿中，立即混匀，加入最后一个试剂的同时开始时，在340 nm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 $\Delta A=A_2-A_1$ 。

六、FBP 活性计算

(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1 nmol 的NADPH 定义为一个酶活力单位。

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

(2) 按样本鲜重计算

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

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

(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1 nmol 的NADPH 定义为一个酶活力单位。

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

V_{反总}：反应体系总体积，1×10⁻³ L； ϵ ：NADPH 摩尔消光系数，6.22×10³ L / mol /cm；d：比色皿光径，1cm；V_样：加入样本体积，0.1 mL；V_{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。