

使用说明书

Instruction Manual

果糖-1, 6-二磷酸酯酶活性检测试剂盒（紫外分光光度法）

FBP Assay Kit (UV Spectrophotometry)

产品描述

果糖-1,6 二磷酸酯酶 (Fructose 1,6-bisphosphatase, FBP) 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。

检测原理

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。

产品组成及储存条件

50T/48S 规格的产品组成如下:

组成	规格	储存条件
CB0072UV-ES1	50mL×1 瓶	4℃保存。
CB0072UV-ES2	50mL×1 瓶	4℃保存。
CB0072UV-A	粉剂×1 瓶	-20℃保存; 临用前加入 40mL CB0072UV-D 充分溶解待用, 用剩的试剂 4℃保存。
CB0072UV-B	18μL×1 瓶	4℃保存; 临用前加入 2.5mL 蒸馏水充分溶解待用, 用剩的试剂 4℃保存。
CB0072UV-C	粉剂×1 瓶	-20℃保存; 临用前加入 2.5mL 蒸馏水充分溶解待用, 用剩的试剂 4℃保存。
CB0072UV-D	50mL×1 瓶	4℃保存。

注: 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

操作说明

一、自备用品:

紫外分光光度计、1mL 石英比色皿、恒温水浴锅、台式离心机、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

二、样本的前处理:

- 总 FBP 酶提取: 建议称取约 0.1g 样本, 加入 1mL CB0072UV-ES1, 冰浴匀浆后超声破碎 (冰浴, 200W, 破碎 3s, 间歇 7s, 总时间 1min), 然后 4℃, 8000g 离心 10min, 取上清测定。
- 胞浆和叶绿体 FBP 酶的分离: 按照植物组织质量 (g): 提取液体积 (mL) 为 1: 5-10 的比例 (建议称取约 0.1g 样本, 加入 1mL CB0072UV-ES1), 冰浴匀浆后于 4℃, 200g 离心 5min, 弃沉淀, 取上清在 4℃, 8000g 离心 10min, 取上清用于测定胞浆 FBP 酶活性, 取沉淀加 1mL CB0072UV-ES2, 震荡溶解后超声破碎 (冰浴, 200W, 破碎 3s, 间歇 7s, 总时间 1min), 然后 4℃, 8000g 离心 10min, 取上清测定叶绿体中 FBP 酶活性。
- 建议测定总 FBP 酶活性, 按照步骤 1 提取粗酶液, 若需要分别测定胞浆和叶绿体中的 FBP, 则按照步骤 2 提取粗酶液。

三、测定步骤:

- 紫外分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 340nm, 蒸馏水调零。

- 将 CB0072UV-A、B、C 置 37°C(哺乳动物)或 25°C(其它物种)预热 10 分钟。
- 操作表 (在 1mL 石英比色皿中依次加入):

试剂名称	测定管 (μL)	空白管 (μL)
样本	100	
提取液		100
CB0072UV-B	50	50
CB0072UV-C	50	50
CB0072UV-A	800	800

立即混匀, 加入最后一个试剂的同时开始计时, 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 ΔA 测定 = A2 测定 - A1 测定, ΔA 空白 = A2 空白 - A1 空白, $\Delta A = \Delta A$ 测定管 - ΔA 空白管。

四、FBP 活性计算:

- 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。

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

- 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。

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

注: $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, 1×10^{-3} 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, 0.1 mL; $V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积, 1mL; T : 反应时间, 5 min; Cpr : 样本蛋白质浓度, mg/mL; W : 样本质量, g。

注意事项

- 蛋白定量测定, 建议使用 TargetMol 生产的 BCA Protein Quantification Kit (C0050)。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品或药品, 不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

