

果糖-1,6-二磷酸（酯）酶(Fructose 1,6-bisphosphatase, FBP)
试剂盒说明书
(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℃保存	
试剂一	粉剂 mg×1 支	4℃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℃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℃保存	
试剂四	液体 20mL×1 瓶	4℃保存	
试剂五	粉剂 mg×1 支	4℃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℃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℃，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℃。
- ② 试剂解冻至室温（25℃）。
- 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℃）孵育 5min	
试剂五	20

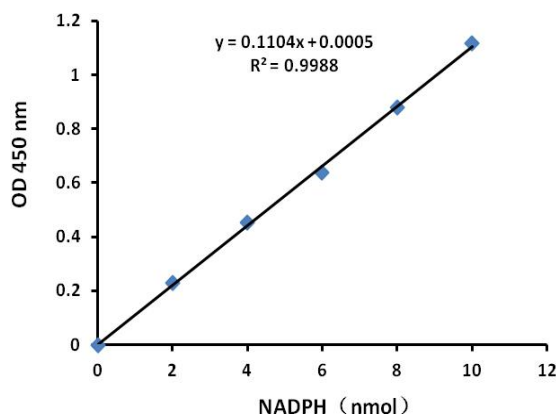
混匀，于 450nm 处测定，1min 时读取 A1，15min 后读取 A2， $\Delta A = A2 - A1$ 。

【注】1. 若 ΔA 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 μ L 试剂五换成 20 μ L 蒸馏水，其他试剂照加，则 $\Delta A = \Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{对照}}$ 。

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 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。

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

$$= 60.4 \times (\Delta A - 0.0005) \div Cpr$$

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。

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

$$= 60.4 \times (\Delta A - 0.0005) \div W$$

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/ μ 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℃ 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/ μ L。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 10 μ L 标准品+10 μ L 试剂三+40 μ L 蒸馏水+140 μ L 试剂四，450nm 读取吸光值 A。根据结果即可制作标准曲线。