

## 果糖-1,6-二磷酸酶(Fructose 1,6-bisphosphatase, FBP)试剂盒说明书

分光光度法 50 管/48 样

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

### 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。

### 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。

### 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。

### 试剂的组成和配制

提取液一：液体 50mL×1 瓶，4℃保存。

提取液二：液体 50mL×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 18μL×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；

### 样本的前处理

①**总 FBP 酶提取**：建议称取约 0.1g 样本，加入 1mL 提取液一，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。

②**胞浆和叶绿体 FBP 酶分离**：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 提取液一），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 提取液二，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。

### 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 (μL)	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  $\Delta A = A2 - A1$ 。

### 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。

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

- (2) 按样本鲜重计算

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

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

$V_{\text{反总}}$ ：反应体系总体积， $1 \times 10^{-3}$  L； $\epsilon$ ：NADPH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3$  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； $C_{\text{pr}}$ ：样本蛋白质浓度，mg/mL； $W$ ：样本质量，g。