

植物果糖-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），有两种 FBPase 存在于光合细胞中。胞质型 FBP 主要存在于细胞质，参与蔗糖合成和糖异生途径；叶绿体型 FBP 存在于叶绿体中，它在二氧化碳同化途径中发挥调节作用。

FBP 催化 1,6 二磷酸果糖和水生成 6 磷酸果糖和无机磷，接着与酶促复合物相互作用，伴随着 NADPH 的生成，通过检测 NADPH 在 340nm 处的增加速率，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
提取液一	液体 100mL×1 瓶	4℃保存	
提取液二	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 20mL×1 瓶	4℃保存	
试剂四	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。

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：

- ① 总FBP酶提取：建议称取约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。
- ② 胞浆和叶绿体 FBP 酶的分离：
- 称取约0.2g样本，加入1mL提取液一，快速冰浴匀浆后于4℃，1600rpm离心5min，弃沉淀，取上清再4℃，5000rpm离心15min，取上清用于测定胞浆FBP酶活性，取沉淀加1mL提取液二，强力涡旋震荡15s，置于冰上(或冰箱)孵育15min，在4℃，13000rpm离心5min，取上清测定叶绿体中FBP酶活性。提示：整个叶绿体的提取过程须保持4℃低温环境。
- 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。

【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 340nm，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	150
轻轻混匀，室温（25℃）孵育 5min	
试剂四	20
混匀，于 340nm 处测定，10s 时读取 A1，10min 后读取 A2， $\Delta A=A2-A1$ 。	

【注】若 ΔA 在零附近徘徊，可以延长至 20min 后重新读取 A2，或则增加样本量 V1（如增至 20 μ L，则试剂三相应减少），则改变后的反应时间 T 或样本量 V1 需重新代入计算公司计算。

五、结果计算：

1、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。

$$\begin{aligned}\text{FBP}(\text{nmol/min /mg prot}) &= [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T \\ &= 643.1 \times \Delta A \div \text{Cpr}\end{aligned}$$

2、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。

$$\begin{aligned}\text{FBP}(\text{nmol/min /g 鲜重}) &= [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T \\ &= 643.1 \times \Delta A \div W\end{aligned}$$

V---加入提取液体积，1 mL；

V1---加入样本体积，0.01mL；

V2---反应体系总体积，2 $\times 10^{-4}$ L；

d---96 孔板光径，0.5cm；

ϵ ---NADPH 摩尔消光系数，6.22 $\times 10^3$ L / mol /cm；

W---样本质量，g；

T---反应时间，10min；

Cpr---蛋白浓度（mg/mL），建议使用本公司的 BCA 蛋白含量测定试剂盒。