

果糖-1, 6-二磷酸酶 (FBP)/果糖-1, 6-二磷酸酯酶检测试剂盒 (定磷法/微量法)

货号: PMK1892

保存: -20℃避光保存 12 个月

规格: 48T/96T

适用样本: 动植物组织、细胞、真菌、细菌、血清(浆)等液体样本

产品简介

果糖-1,6-二磷酸酶 (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。本试剂盒提供了一种简单的检测方法, 用于检测生物样本中 FBP 的活性。其原理是 FBP 催化 1,6-二磷酸果糖和水, 生成 6-磷酸果糖和无机磷, 利用钼蓝法测定无机磷含量的增加, 即可反映 FBP 活性。

产品内容

试剂盒组分	规格		储存条件
	48T	96T	
提取液	50mL	100mL	4℃ 保存
试剂一	粉剂×1 瓶	粉剂×1 瓶	-20℃ 保存
试剂二	12.5mL	25mL	-20℃ 保存
试剂三	粉剂×1 支	粉剂×1 支	4℃ 保存
试剂四	粉剂×1 支	粉剂×1 支	4℃ 保存
试剂五	粉剂×1 支	粉剂×1 支	4℃ 保存
试剂六	5mL	10mL	室温保存
标准品	1mL	1mL	4℃ 保存

自备耗材

酶标仪或分光光度计 (能测 660nm 处的吸光度) 及水浴锅

96 孔板或微量玻璃比色皿、可调节式移液枪及枪头

低温离心机、制冰机

去离子水

匀浆器

试剂准备

提取液: 即用型; 4℃ 保存。

试剂一: 临用前 48T 加入 10mL 试剂二, 96T 加入 20mL 试剂二充分溶解待用; 用不完的试剂分装后-20℃ 保存, 避免反复冻融。

试剂二: 即用型; 使用前, 平衡到室温; 4℃ 保存。

试剂三: 临用前配制, 48T 加入 2mL 去离子水充分溶解, 96T 加入 4mL 去离子水充分溶解后使用。

试剂四: 临用前配制, 48 T 加入 5mL 去离子水充分溶解, 96T 加入 10mL 去离子水充分溶解后使用。

试剂五: 临用前配制, 48 T 加入 5mL 去离子水充分溶解, 96 T 加入 10mL 去离子水充分溶解后使用。

试剂六: 即用型; 室温保存。

定磷试剂的配制: 配制比例按照 H₂O : 试剂四: 试剂五: 试剂六=2:1:1:1 的比例配制, 配好的定磷试剂应为浅黄色。若无色则试剂失效, 若是蓝色则为磷污染 (请根据需要, 用多少配多少)。

产品说明书

注意：配试剂最好用新的玻璃器皿或者一次性塑料器皿，以避免磷污染。

标准曲线设置：按下表所示用去离子水将 10mM 标准品稀释为 1、0.5、0.25、0.125、0.0625、0.0313、0.0156 mM 的标准溶液。

	标准品体积 (μL)	去离子水体积 (μL)	标准品浓度 (mM)
Std. 1	100μL 10mM	900	1
Std. 2	100μL of Std. 1 (1mM)	100	0.5
Std. 3	100μL of Std. 2 (0.5mM)	100	0.25
Std. 4	100μL of Std. 3 (0.25mM)	100	0.125
Std. 5	100μL of Std. 4 (0.125mM)	100	0.0625
Std. 6	100μL of Std. 5 (0.0625mM)	100	0.0313
Std. 7	100μL of Std. 6 (0.0313mM)	100	0.0156

样本制备

动植物组织：称取约 0.1g 样本，加入 1mL 提取液，冰浴匀浆。8,000g，4℃离心 10min，取上清液，置冰上待测。

细胞或细菌：收集 500 万细胞或细菌到离心管内，用冷 PBS 清洗细胞或细菌，离心后弃上清，加入 1mL 提取液，冰浴超声波破碎细胞或细菌 5min（功率 20%或 200W，超声 3s，间隔 7s，重复 30 次），然后 8,000g，4℃离心 10min，取上清液，置冰上待测。

注意：推荐使用新鲜样本，如果不立即进行实验，样本可在-80℃保存 1 个月。如需测定蛋白浓度，推荐使用 Bradford 法蛋白质定量试剂盒进行样本蛋白质浓度测定。

实验步骤

1. 酶标仪或可见分光光度计预热 30min 以上，调节波长到 660nm，可见分光光度计去离子水调零。
2. 将溶解后的试剂一置于 37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）预热 5 分钟。
3. 酶促反应（在 EP 管中依次加入下列试剂）：

	空白管 (μL)	标准管 (μL)	测定管 (μL)	对照管 (μL)
试剂一	0	0	180	180
样本	0	0	20	0

混匀后盖紧，37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）准确孵育 10min

试剂三	0	0	20	20
样本	0	0	0	20

混匀后，室温（25℃左右），4,000g，离心 10min，取上清液；

4. 定磷（在 96 孔板或微量玻璃比色皿中加入下列试剂）

上清	0	0	40	40
不同浓度标准品	0	40	0	0
去离子水	40	0	0	0
定磷试剂	200	200	200	200

混匀，室温静置 10min 后，测定 660nm 吸光值。计算 $\Delta A_{\text{测}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ ， $\Delta A_{\text{标}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$ 。（空白管只需做 1 管）

产品说明书

5. 注意：为保证实验结果的准确性，需先取 1-2 个样做预实验，如果测定的吸光值过高（高于 1.5）可用提取液稀释样本后再测定，计算结果时注意乘以稀释倍数。

结果计算

1. 标准曲线的绘制

以标准液浓度为 y 轴， $\Delta A_{\text{标}}$ 为 x 轴，绘制标准曲线（浓度为 y 轴更方便计算结果）。

2. 无机磷 (Pi) 含量的计算

将 $\Delta A_{\text{测}}$ 带入方程得到 y 值 (mM)。

3. FBP 活性计算

(1) 按样本鲜重计算：

单位的定义：每 g 组织在反应体系中每分钟生成 1nmol 无机磷定义为一个酶活力单位 U。

$$\text{FBP (U/g 鲜重)} = (y \times V_{\text{反总}} \times 10^6) \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T = 1000 \times y \div W$$

(2) 按液体样本体积计算：

单位的定义：每 mL 液体样本在反应体系中每分钟生成 1nmol 无机磷定义为一个酶活力单位 U。

$$\text{FBP (U/mL)} = (y \times V_{\text{反总}} \times 10^6) \div V_{\text{样}} \div T = 1000 \times y$$

(3) 按细菌或细胞数量计算：

单位的定义：每 10^4 个细菌或细胞在反应体系中每分钟生成 1nmol 无机磷定义为一个酶活力单位 U。

$$\text{FBP (U/10}^4 \text{ Cells)} = (y \times V_{\text{反总}} \times 10^6) \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times 500) \div T = 2 \times y$$

(4) 按样本蛋白浓度计算：

单位的定义：每 mg 组织蛋白在反应体系中每分钟生成 1nmol 无机磷定义为一个酶活力单位 U。

$$\text{FBP (U/mg prot)} = (y \times V_{\text{反总}} \times 10^6) \div (Cpr \times V_{\text{样}}) \div T = 1000 \times y \div Cpr$$

$V_{\text{反总}}$ ：酶促反应体系总体积， 2×10^{-4} L； 10^6 ： $1\text{mmol} = 1 \times 10^6 \text{nmol}$ ； $V_{\text{样}}$ ：加入样本体积，0.02mL； $V_{\text{样总}}$ ：加入提取液体积，1mL；T：反应时间，10min；W：样品质量，g；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；500：细菌或细胞总数， 5×10^6 。

注意事项

1. 实验过程中请穿戴实验服、口罩和乳胶手套。请按照生物实验室的国家安全规定进行实验，尤其是在检测血样或其他体液时。
2. 本试剂盒仅用于实验室科学研究，如果本试剂盒用于临床诊断或任何其他用途，我们将不对任何后果负责。
3. 本试剂盒应在有效期内使用，并请严格按照说明书进行存储。
4. 不同批次号、不同厂家之间的组分不要混用；否则，可能导致结果异常。
5. 勤换吸头，避免各组分之间的交叉污染。

相关产品：

PMK1233 磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶 (PEPCK) 检测试剂盒 (微量法)

PMK1234 葡萄糖-6-磷酸酶 (G6P) 检测试剂盒 (NADH 速率法)

PMK1235 果糖-1,6-二磷酸酶 (FBP)/果糖-1,6-二磷酸酯酶检测试剂盒 (NADPH 速率法)

PMK1236 丙酮酸羧化酶 (PC) 检测试剂盒 (NADH 速率法)

PMK1885 丙酮酸羧化酶 (PC) 检测试剂盒 (微量法)

更多产品详情了解，请关注公众号：

