

果糖-1,6-二磷酸（酯）酶（FBP）活性检测试剂盒说明书

微量法

注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。

货号：BC0925

规格：100T/96S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 110 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	粉剂×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	液体 8 μL×1 瓶	-20℃保存
试剂三	粉剂×2 支	-20℃保存
试剂四	液体 25 mL×1 瓶	2-8℃保存

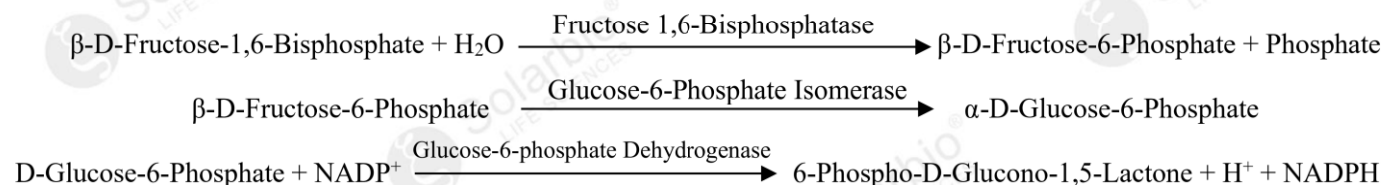
溶液的配制：

1. 试剂一：临用前加入 20 mL 试剂四充分溶解待用，用不完的试剂分装后-20℃保存 4 周，避免反复冻融。
2. 试剂二：液体置于试剂瓶内 EP 管中。临用前加入 1.1 mL 蒸馏水充分溶解待用，用不完的试剂分装后-20℃保存 4 周，避免反复冻融。
3. 试剂三：临用前取一支试剂三加入 0.77 mL 蒸馏水充分溶解待用，用不完的试剂分装后-20℃保存 4 周，避免反复冻融（该试剂为冻干试剂，可能存在肉眼观察试剂量相差较大甚至量很少的现象，此现象不影响使用，实际质量相同）。

产品说明：

果糖-1,6-二磷酸酶（Fructose 1,6-bisphosphatase, FBP, EC 3.1.3.11）又称果糖-1,6-二磷酸酯酶，其在糖异生过程和光合作用同化物蔗糖的合成中起关键性的作用。催化1,6-二磷酸果糖和水生成6-磷酸果糖和无机磷。

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，测定340nm下NADPH的增加速率，即可计算FBP活性。



注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。

需自备的仪器和用品：

紫外分光光度计/酶标仪、天平、低温离心机、微量石英比色皿/96孔UV板、可调式移液枪、研钵/匀浆器/细胞超声破碎仪、冰和蒸馏水。

操作步骤：

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）





组织：按照质量（g）：提取液体积（mL）为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g，加入 1mL 提取液）进行冰浴匀浆。于 4℃，8000g，离心 10min，取上清，置冰上待测。

细胞：按照细胞数量（10⁴个）：提取液体积（mL）为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细胞加入 1mL 提取液），冰浴超声波破碎细胞（功率 300w，超声 3 秒，间隔 7 秒，总时间 3min），于 4℃，8000g，离心 10min，取上清，置冰上待测。

二、测定步骤

1、分光光度计/酶标仪预热30min以上，调节波长至340nm，紫外分光光度计蒸馏水调零。

2、根据样本量取部分试剂—37℃(哺乳动物)或25℃(其它物种)预热10min。

3、操作表：(在微量石英比色皿/96孔UV板中依次加入下列试剂)

	测定管	空白管
样本（μL）	20	-
提取液（μL）	-	20
试剂二（μL）	10	10
试剂三（μL）	10	10
试剂一（μL）	160	160

在微量石英比色皿/96孔UV板中分别加入上述试剂，充分混匀后于340nm处测定10s时的吸光值A1，迅速置于37℃(哺乳动物)或25℃(其它物种)水浴或培养箱5min（酶标仪有控温功能可直接调节温度），拿出迅速擦干测定310s时的吸光值A2，计算ΔA测定管=A2测定-A1测定，ΔA空白管=A2空白-A1空白，ΔA=ΔA测定管-ΔA空白管。（空白管只需做1-2次）

若样本数量过多，可根据样本量按操作表加样比例将试剂二、试剂三、试剂一（预热后）配制成工作液使用。

三、FBP酶活性计算

A 按微量石英比色皿计算

1. 按蛋白浓度计算

单位的定义：每mg组织蛋白每分钟生成1nmol的NADPH定义为一个酶活单位。

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

2. 按样本质量计算

单位的定义：每g组织每分钟生成1nmol的NADPH定义为一个酶活单位。

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

3. 按细胞密度计算

单位的定义：每10⁴个细胞每分钟生成1nmol的NADPH定义为一个酶活单位。

$$\text{FBP (U/10}^4 \text{ cell)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times N) \div T \times F = 321.5 \times \Delta A \div N \times F$$

V反总：反应体系总体积，2×10⁻⁴L；ε：NADPH摩尔消光系数，6.22×10³ L/mol/cm；d：微量石英比色皿光径，1cm；V样：加入样本体积，0.02mL；V样总：加入提取液体积，1mL；T：反应时间，5min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；N：细胞数量，以万计；10⁹：单位换算系数，1mol=10⁹nmol；F：样本稀释倍数。

B 按96孔板计算

将上述公式中的d-1cm改为d-0.6cm（96孔UV板光径）进行计算即可。

注意事项：

1、当ΔA大于0.6时，建议将样本稀释后再进行测量，注意同步修改计算公式。



2、空白管为检测各试剂组分质量的检测孔，正常情况下，变化不超过0.02。

实验实例：

- 1、取 0.1g 胰脏组织加入 1mL 提取液进行匀浆研磨，取上清后按照测定步骤操作，用微量石英比色皿测得计算 ΔA 测定管=A2 测定-A1 测定=0.1957-0.1655=0.0302， ΔA 空白管=A2 空白-A1 空白=0.0779-0.065=0.0129， $\Delta A = \Delta A$ 测定管- ΔA 空白管=0.0302-0.0129=0.0173，按样本质量计算酶活得：
 $FBP (U/g \text{ 质量}) = 321.5 \times \Delta A \div W = 321.5 \times 0.0173 \div 0.1 = 55.6195 U/g \text{ 质量}$ 。
- 2、取 0.1g 黑麦草加入 1mL 提取液进行匀浆研磨，取上清后按照测定步骤操作，用微量石英比色皿测得计算 ΔA 测定管=A2 测定-A1 测定=0.7224-0.6267=0.0957， ΔA 空白管=A2 空白-A1 空白=0.0779-0.065=0.0129， $\Delta A = \Delta A$ 测定管- ΔA 空白管=0.0957-0.0129=0.0828，按样本质量计算酶活得：
 $FBP (U/g \text{ 质量}) = 321.5 \times \Delta A \div W = 321.5 \times 0.0828 \div 0.1 = 266.202 U/g \text{ 质量}$ 。

相关发表文献：

- [1] Bai D, Du J, Bu X, Cao W, Sun T, Zhao J, Zhao Y, Lu N. ALDOA maintains NLRP3 inflammasome activation by controlling AMPK activation. *Autophagy*. 2022 Jul;18(7):1673-1693. doi: 10.1080/15548627.2021.1997051. Epub 2021 Nov 25. PMID: 34821530; PMCID: PMC9298449.
- [2] Yuan Y, Zhu C, Wang Y, Sun J, Feng J, Ma Z, Li P, Peng W, Yin C, Xu G, Xu P, Jiang Y, Jiang Q, Shu G. 伪-Ketoglutaric acid ameliorates hyperglycemia in diabetes by inhibiting hepatic gluconeogenesis via serpinin signaling. *Sci Adv*. 2022 May 6;8(18):eabn2879. doi: 10.1126/sciadv.abn2879. Epub 2022 May 4. PMID: 35507647; PMCID: PMC9067931.
- [3] Peng L, Lou W, Xu Y, Yu S, Liang C, Alloul A, Song K, Vlaeminck SE. Regulating light, oxygen and volatile fatty acids to boost the productivity of purple bacteria biomass, protein and co-enzyme Q10. *Sci Total Environ*. 2022 May 20;822:153489. doi: 10.1016/j.scitotenv.2022.153489. Epub 2022 Feb 2. PMID: 35122839.
- [4] Liang X, Liu X, Li W, Zhang L, Zhang B, Lai G, Zhao Y. A novel variant in the FBP1 gene causes fructose-1,6-bisphosphatase deficiency through increased ubiquitination. *Arch Biochem Biophys*. 2023 Jul 1;742:109619. doi: 10.1016/j.abb.2023.109619. Epub 2023 May 2. PMID: 37142076.
- [5] Zhu M, He Y, Zhu M, Ahmad A, Xu S, He Z, Jiang S, Huang J, Li Z, Liu S, Hou X, Zhang Z. ipal improves rice drought tolerance at seedling stage mainly through activating abscisic acid pathway. *Plant Cell Rep*. 2022 Jan;41(1):221-232. doi: 10.1007/s00299-021-02804-3. Epub 2021 Oct 25. PMID: 34694441.

相关系列产品：

- BC0730/BC0735 丙酮酸羧化酶（PC）活性检测试剂盒
BC3310/BC3315 磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶（PEPCK）活性检测试剂盒
BC3320/BC3325 葡萄糖-6-磷酸酶（G6P）活性检测试剂盒

