

果糖1,6-二磷酸醛缩酶 (Fructose-1,6-bisphosphate aldolase, FBA)

试剂盒说明书

(货号: G0822W 微板法 96 样)

一、产品简介:

果糖 1,6-二磷酸醛缩酶(EC 4.1.2.13, FBA)既存在于糖酵解/糖异生途径中又存在于磷酸戊糖循环途径中,为生物体物质合成代谢提供能量 ATP 和底物,因此果糖 1,6-二磷酸醛缩酶对细胞生命活动起到至关重要的作用。

FBA 可催化果糖 1,6-二磷酸生成 3-磷酸甘油醛和磷酸二羟丙酮,在酶促复合物的相继作用下催化 NADH 和磷酸二羟丙酮生成 NAD⁺和 α -磷酸甘油,检测 340nm 处 NADH 的下降速率即可得出 FBA 活性的高低。

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×4 支	-20℃保存	用前甩几下或离心使试剂落入底部,每支加 0.3mL 蒸馏水溶解,用不完的试剂分装后-20℃保存,禁止反复冻融,三天内用完。
试剂二	液体 μ L×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,可-20℃分装冻存,尽量避免反复冻融。
试剂三	液体 16mL×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 1.7mL 蒸馏水溶解备用。

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、可调式移液器、天平、震荡仪、水浴锅、低温离心机、研钵。

四、果糖 1,6-二磷酸醛缩酶 (FBA) 活性测定:

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 组织样本:

称 0.1g 组织样本,加入 1mL 提取液进行冰浴匀浆,于 4℃,12000rpm 离心 10min,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 细菌/细胞样本:

先收集细菌或细胞到离心管内,离心后弃上清;取 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液;超声波破碎细菌或细胞(冰浴,功率 20%或 200W,超声 3s,间隔 10s,重复 30 次);4℃约 12,000rpm 离心 10min,取上清作为待测样品。

【注】:若增加样本量,可按照细菌/细胞数量 (10⁴):提取液 (mL) 为 500~1000:1 的比例进行提取。

2、上机检测:

① 酶标仪预热 30min,调节波长至 340nm,设定温度 25℃。

② 所有试剂解冻至室温 (25℃),或可放在 25℃条件下水浴 5-15min。

③ 试剂二和三和四可按照 10:145:15 比例配成混合液(一枪加 170 μ L 该混合液)(该混合液

用多少配多少，现配现用)。

④ 在 96 孔板中依次加入：

试剂名称 (μL)	测定管
样本	20
试剂一	10
试剂二	10
试剂三	145
试剂四	15

轻轻混匀，室温 (25°C) 下于 340nm 处测定，1min 时读取 A1，5min 后读取 A2， $\Delta A=A1-A2$ 。

【注】1.若 ΔA 小于 0.01，可适当延长反应时间 T (如由 5min 延至 15min 后读取 A2)，或适当加大样本量 V1(如由 20μL 增至 50μL，则试剂三相应减少)，则改变后的 T 和 V1 需代入计算公式重新计算。

2.若下降趋势不稳定，可以每隔 10S 读取一次吸光值，选取一段线性下降的时间段来参与计算，相对应的 A 值也代入计算公式重新计算。

3.若起始值 A1 太大如超过 2 (如颜色较深的植物叶片，一般色素较高，则起始值相对会偏高)，可以适当减少样本加样量，则改变后的加样体积需代入计算公式重新计算。

或向待测样本中加少许活性炭混匀静置 5min 后 12000rpm4°C 离心 10min，上清液用于检测；

4.若 ΔA 大于 0.6，可减少反应时间 T (如由 5min 减至 2min 后读取 A2)，则改变后的反应时间 T 代入计算公式重新计算。

五、结果计算：

1、按照样本蛋白浓度计算：

酶活定义：每毫克组织蛋白每分钟消耗 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$FBA(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot})=[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (V1 \times Cpr) \div T = 643.08 \times \Delta A \div Cpr$$

2、按照样本质量计算：

酶活定义：每克组织每分钟消耗 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$FBA(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重})=[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T = 643.08 \times \Delta A \div W$$

3、按细胞数量计算：

酶活定义：每 10^4 个细胞每分钟消耗 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$FBA(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell})=[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 643.08 \times \Delta A \div 500$$

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

d---比色皿光径，0.5cm；

V---加入提取液体积，1mL；

V1---加入样本体积，0.02mL；

V2---反应体系总体积， $0.2\text{mL}=2 \times 10^{-4}\text{L}$ ；

T---反应时间，5 min；

W---样本质量，g；

500---细胞数量，万；

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。