

Fructose-1,6-bisphosphate Aldolase Activity Assay Kit

果糖 1,6-二磷酸醛缩酶 (FBA) 试剂盒说明书

货号: G0822W | 方法: 微板法 | 规格: 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(10^4):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 170μL 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℃）下于 340nm 处测定，1min 时读取 A1，5min 后读取 A2， $\Delta A=A1-A2$ 。	

注意：本操作流程适用于绝大多数常规样本检测，实验条件可根据实际样本状态适度微调；针对特殊类型样本，我司技术支持可提供专属优化建议。

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。

$$FBA(\text{nmol/min/mg prot})=[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times 10^9] \div (V_1 \times Cpr) \div T = 643.08 \times \Delta A \div Cpr$$

- 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。

$$FBA(\text{nmol/min/g 鲜重})=[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times 10^9] \div (W \times V_1 \div V) \div T = 643.08 \times \Delta A \div W$$

- 3、按细胞数量计算：

酶活定义：每 10⁴ 个细胞每分钟消耗 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$FBA(\text{nmol/min}/10^4 \text{ cell})=[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times 10^9] \div (500 \times V_1 \div V) \div T = 643.08 \times \Delta A \div 500$$

ϵ ---NADH 摩尔消光系数，6.22×10³ L / mol /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，0.2mL=2×10⁻⁴L；

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。