

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

试剂盒说明书
(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	使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	使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	使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℃) 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20 μL 增至50 μL, 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℃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。

$$FBA(\text{nmol/min/mg prot}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 109] \div (V1 \times Cpr) \div T = 643.08 \times \Delta A \div Cpr$$

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。

$$FBA(\text{nmol/min/g 鲜重}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 109] \div (W \times V1 \div V) \div T = 643.08 \times \Delta A \div W$$

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。

$$FBA(\text{nmol/min/10}^4\text{cell}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 109] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 643.08 \times \Delta A \div 500$$

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

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, 5min;

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。