

果糖 1,6-二磷酸醛缩酶 (Fructose 1,6 bisphosphate aldolase, FBA) 试剂盒说明书

分光光度法 50 管/48 样

注 意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

测定意义：

植物叶绿体中果糖 1,6-二磷酸醛缩酶是光合作用中参与 calvin 循环的重要酶。催化果糖 1,6-二磷酸和景天庚酮糖 1,7-二磷酸的合成反应，在各种逆境胁迫下表现不同的响应。

测定原理：

果糖 1,6-二磷酸醛缩酶催化果糖 1,6-二磷酸生成 3-磷酸甘油醛和磷酸二羟丙酮，在磷酸丙糖异构酶和 α -磷酸甘油脱氢酶作用下催化 NADH 和磷酸二羟丙酮生成 NAD 和 α -磷酸甘油，340nm 处吸光值的变化可反映果糖 1,6-二磷酸醛缩酶活性的高低。

自备实验用品及仪器：

天平、低温离心机、震荡仪、研钵、紫外分光光度计、1 mL 石英比色皿。

试剂组成和配制：

提取液一：液体 50mL×1 瓶，4℃ 保存。

提取液二：液体 50mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂一：液体 25mL×1 瓶，4℃ 避光保存。

试剂二：粉剂×1 瓶，-20℃ 避光保存。临用前加 5mL 蒸馏水充分溶解；用不完的试剂分装后-20℃ 保存，禁止反复冻融。

试剂三：粉剂×1 瓶，-20℃ 避光保存。临用前加 5 mL 蒸馏水充分溶解；用不完的试剂分装后-20℃ 保存，禁止反复冻融。

试剂四：粉剂×1 瓶，-20℃ 避光保存。临用前加 5 mL 蒸馏水充分溶解；用不完的试剂分装后-20℃ 保存，禁止反复冻融。

试剂五：液体×1 瓶，4℃ 避光保存；用不完的试剂分装后-20℃ 保存，禁止反复冻融。

酶液提取：

①**总 FDA 酶提取：**建议称取约 0.1g 样本，加入 1mL 提取液一，冰浴匀浆后超声破碎（冰浴，200W，破碎 3s，间歇 7s，总时间 1min），然后 4℃，8000g 离心 10min，取上清测定。

②**胞浆和叶绿体 FDA 酶分离：**按照植物组织质量 (g)：提取液体积(mL)为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 样本，加入 1mL 提取液一），冰浴匀浆后于 4℃，200g 离心 5min，弃沉淀，取上清在 4℃，8000g 离心 10min，取上清用于测定胞浆 FDA 酶活性，取沉淀加 1mL 提取液二，震荡溶解后超声破碎（冰浴，200W，破碎 3s，间歇 7s，总时间 1min），然后 4℃，8000g 离心 10min，取上清测定叶绿体中 FDA 酶活性。

建议测定总 FDA 酶活性，按照步骤①提取粗酶液，若需要分别测定胞浆和叶绿体中的 FDA，则按照步骤②提取粗酶液。

测定操作:

1. 分光光度计预热 30min, 调节波长至 340nm, 蒸馏水调零。
2. 取 1mL 石英比色皿, 依次加入 500 μ L 试剂一, 100 μ L 试剂二, 100 μ L 试剂三, 100 μ L 试剂四, 100 μ L 试剂五, 100 μ L 粗酶液, 充分混匀, 记录 340nm 处 10s 的吸光值 A1 和 310s 的吸光值 A2, $\Delta A=A1-A2$

计算公式:

(1) 按照样本蛋白浓度计算

酶活单位定义: 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。

$$FDA \text{ (nmol/min /mg prot)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 321.54 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

(2) 按照样本质量计算

酶活单位定义: 每克组织每分消耗 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$FDA \text{ (nmol/min /g 鲜重)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} + V_{\text{样总}}) \div T = 321.54 \times \Delta A \div W$$

(3) 按照细胞数量计算

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

$$FDA \text{ (nmol/min /10}^4 \text{ cell)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{细胞数量} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ = 321.54 \times \Delta A \div \text{细胞数量}$$

(4) 按照液体体积计算

酶活单位定义: 每毫升液体每分钟消耗 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$FDA \text{ (nmol/min /mL)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T = 321.54 \times \Delta A$$

V 反总: 反应体系总体积, 1mL; ϵ : NADH 摩尔消光系数, 6.22 $\times 10^3$ L / mol /cm; d: 比色皿光径, 1cm; V 样: 加入样本体积, 0.1mL; V 样总: 加入提取液体积, 1mL; T: 反应时间, 5 min; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量, g

To be with you