

## 果糖1,6-二磷酸醛缩酶 (FBA) 试剂盒说明书

(货号: ADS-F-GH003-48 分光法 48 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 $\alpha$ -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 60mL×1 瓶 | 4°C保存   |   |
| 试剂一  | 液体 1 支      | -20°C保存 | 使用前甩几下或离心使试剂落入底部, 再加 2.1mL 蒸馏水溶解备用。                                 |
| 试剂二  | 粉剂 4 支      | -20°C保存 | 使用前甩几下或离心使试剂落入底部, 每支加 0.6mL 蒸馏水溶解, 用不完的试剂分装后-20°C保存, 禁止反复冻融, 三天内用完。 |
| 试剂三  | 液体 1 支      | -20°C保存 | 使用前甩几下或离心使试剂落入底部, 再加 2.2mL 蒸馏水溶解备用。                                 |
| 试剂四  | 液体 30mL×1 瓶 | 4°C保存   |   |
| 试剂五  | 粉剂 1 支      | 4°C保存   | 使用前甩几下或离心使试剂落入底部, 再加 4.2mL 蒸馏水溶解备用。                                 |

### 三、所需的仪器和用品:

紫外分光光度计、1mL 石英比色皿 (光径 1cm)、可调式移液器、天平、震荡仪、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°C, 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°C 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 紫外分光光度计预热 30min, 调节波长至 340nm, 设定温度 25°C。

② 所有试剂解冻至室温 (25°C)。

③ 在 1mL 石英比色皿 (光径 1cm) 中依次加入:

|                 |     |
|-----------------|-----|
| 试剂名称 ( $\mu$ L) | 测定管 |
|-----------------|-----|

|  |     |
|--|-----|
| 样本   | 80  |
| 试剂一  | 40  |
| 试剂二  | 40  |
| 试剂三  | 40  |
| 试剂四  | 520 |
| 试剂五  | 80  |
| 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 $\Delta A$  的值在零附近，可以适当延长反应时间到 15min 后读取 A2，改变后的反应时间需代入计算公式重新计算。或适当加大样本量，则改变后的加样体积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 12000rpm, 4℃离心 10min，上清液用于检测；
4. 若 $\Delta A$  大于 0.6，可减少反应时间时间（如 2min），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。

$$FBA(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot})=[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (V1 \times Cpr) \div T = 321.54 \times \Delta A \div Cpr$$

### 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。

$$FBA(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重})=[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T = 321.54 \times \Delta A \div W$$

### 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。

$$FBA(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell})=[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.643 \times \Delta A$$

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

d---比色皿光径，1cm；

V---加入提取液体积，1mL；

V1---加入样本体积，0.08mL；

V2---反应体系总体积，0.2mL= $8 \times 10^{-4}$ 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。