

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 有效期：3 个月）

一、指标介绍：

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：

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 60mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 1 瓶	-20℃保存	1. 开盖前注意使试剂落入底部（可手动甩一甩）； 2. 加入 2.1mL 蒸馏水溶解备用； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂二	粉剂 4 支	-20℃保存	每支： 1. 临用前 8000g 4℃离心 2min 使试剂落入管底； 2. 加入 0.6mL 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。
试剂三	液体 1 瓶	-20℃避光保存	1. 开盖前注意使试剂落入底部（可手动甩一甩）； 2. 加入 2.2mL 蒸馏水溶解备用； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂四	液体 30mL×1 瓶	4℃保存	
试剂五	粉剂 1 瓶	4℃保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部（可手动甩一甩）； 2. 加入 4.2mL 蒸馏水溶解备用； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。

三、实验器材：

研钵（匀浆机）、冰盒（制冰机）、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅（烘箱、培养箱、金属浴）、1ml 石英比色皿、离心管、紫外分光光度计、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

四、指标测定：

建议先选取 1-3 个差异大的样本（例如不同类型或分组）进行预实验，熟悉操作流程，根据预实验结果确定或调整样本浓度，以防造成样本或试剂不必要的浪费！

1、样本提取：

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、检测步骤：

① 紫外分光光度计预热 30min，调节波长至 340nm，设定温度 25℃。

② 所有试剂解冻至室温（25℃）。

③ 在 1mL 石英比色皿（光径 1cm）中依次加入：

试剂组分（μL）	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 ΔA 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 ΔA 大于 0.6，可减少反应时间（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。

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

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。

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

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。

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

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

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= $8 \times 10^{-4} \text{ L}$ ；

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。

