

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

微量法 100T/96S

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、震荡仪、低温离心机、研钵、紫外分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔板。

试剂组成和配制：

提取液一：液体 100mL×1 瓶，4℃ 保存。

提取液二：液体 100mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂一：液体 10mL×1 瓶，4℃ 避光保存。

试剂二：粉剂×1 瓶，-20℃ 避光保存。临用前加 2mL 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 2 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 2 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 2mL×1 瓶，4℃ 避光保存。

酶液提取：

①总 FBA 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 FBA 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 FBA 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 FBA 酶活性。

建议测定总 FBA 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 FBA，则按照步骤②提取粗酶液。

测定操作:

1. 紫外分光光度计/酶标仪预热 30min, 调节波长至 340nm, 蒸馏水调零。
2. 取微量石英比色皿/96 孔板, 依次加入 100 μL 试剂一, 20 μL 试剂二, 20 μL 试剂三, 20 μL 试剂四, 20 μL 试剂五, 20 μL 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:

a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下 (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。FBA (nmol/min/mg prot) = $\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 321.54 \times \Delta A \div \text{Cpr}$

(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。

FBA (nmol/min/g 鲜重) = $\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 321.54 \times \Delta A \div W$ (3)

(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。FBA (nmol/min/104 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。FBA (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, 0.2mL; 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 样: 加入样本体积, 0.02mL; 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

b. 用 96 孔板测定的计算公式如下

(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。FBA (nmol/min/mg prot) = $\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 643.08 \times \Delta A \div \text{Cpr}$

(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。

FBA (nmol/min/g 鲜重) = $\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 643.08 \times \Delta A \div W$ (3)

(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。FBA (nmol/min/104 cell) = $\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{细胞数量} \div V_{\text{样总}}) \div T$

$=643.08 \times \Delta A \div \text{细胞数量}$

(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。FBA (nmol/min/mL) = $\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T = 643.08 \times \Delta A$

V 反总: 反应体系总体积, 0.2mL; ϵ : NADH 摩尔消光系数, $6.22 \times 10^3 \text{ L} / \text{mol} / \text{cm}$; d: 比色皿光径, 0.5cm; V 样: 加入样本体积, 0.02mL; 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