

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

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  $\alpha$ -磷酸甘油脱氢酶作用下催化 NADH 和磷酸二羟丙酮生成 NAD 和  $\alpha$ -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 酶的分离: 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  $\mu$ L 试剂一, 20  $\mu$ L 试剂二, 20  $\mu$ L 试剂三, 20  $\mu$ L 试剂四, 20  $\mu$ L 试剂五, 20  $\mu$ 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:**

**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。

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

(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。

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

(3) 按照细胞数量计算

酶活单位定义: 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。

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

(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。

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

V 反总: 反应体系总体积, 0.2mL;  $\epsilon$ : 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, 0.02mL; 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。

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

(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。

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

(3) 按照细胞数量计算

酶活单位定义: 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。

$$\begin{aligned} \text{FBA (nmol/min}/10^4 \text{ cell)} &= \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{细胞数量} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 643.08 \times \Delta A \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

(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。

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

V 反总: 反应体系总体积, 0.2mL;  $\epsilon$ : NADH 摩尔消光系数,  $6.22 \times 10^3$  L/mol/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