

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

微量法 100T/96S

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

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。

组成:

产品名称	PSS013-100T/96S	Storage
提取液一: 液体	100ml	4°C
提取液二: 液体	100ml	4°C
试剂一: 液体	10ml	4°C避光
试剂二: 粉剂	1 瓶	-20°C避光
试剂三: 粉剂	1 瓶	-20°C避光
试剂四: 粉剂	1 瓶	-20°C避光
试剂五: 液体	2ml	4°C避光
说明书	一份	

试剂二: 粉剂×1 瓶, -20°C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°C保存, 禁止反复冻融。

试剂三: 粉剂×1 瓶, -20°C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°C保存, 禁止反复冻融。

试剂四: 粉剂×1 瓶, -20°C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°C保存, 禁止反复冻融。

试剂五: 液体 2ml×1 瓶, 4°C避光保存。

自备仪器和用品:

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。

最终解释权所有 © 伊势久 (江苏连云港) 生物科技有限责任公司, 保留一切权利



伊势久(江苏连云港)生物科技有限责任公司

江苏省连云港市海州区花果山大道 17 号



服务热线: 0518-81263339

官网:<http://www.bio149.com>

酶液提取：

①总 FDA 酶提取 NADPH 的提取：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°C，8000g 离心 10min，取上清测定。

②胞浆和叶绿体 FDA 酶的分离：NADP⁺的提取：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°C，200g 离心 5min，弃沉淀，取上清在 4°C，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°C，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. 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 100μL 试剂一，20μL 试剂二，20μL 试剂三，20μL 试剂四，20μL 试剂五，20μL 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。

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

(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。

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

(3) 按照细胞数量计算

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

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

(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。

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

V 反总：反应体系总体积，0.2ml； ϵ ：NADH 摩尔消光系数， 6.22×10^3 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。

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

(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。

最终解释权所有 © 伊势久（江苏连云港）生物科技有限责任公司，保留一切权利



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

(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。

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

(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。

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

$V_{\text{反总}}$ ：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，0.5cm；

$V_{\text{样}}$ ：加入样本体积，0.02ml； $V_{\text{样总}}$ ：加入提取液体积，1ml； T ：反应时间，5 min； C_{pr} ：样本蛋白质浓度，mg/ml； W ：样本质量，g

