

**果糖1,6-二磷酸醛缩酶（Fructose 1,6 bisphosphate aldolase, FDA）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FDA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FDA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℃，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。

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

(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。

$$\begin{aligned} \text{FDA (nmol/min/104 cell)} &= \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{细胞数量} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 321.54 \times \Delta A \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

(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； $\epsilon$ ：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。

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

(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。

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

(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。

$$\begin{aligned} \text{FDA (nmol/min/104 cell)} &= \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{细胞数量} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 643.08 \times \Delta A \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

(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