

## 植物果糖1,6-二磷酸醛缩酶 (Fructose-1,6-bisphosphate aldolase, FBA)

## 试剂盒说明书

(货号: G0603F 紫外分光法 48 样)

## 一、产品简介:

植物中的果糖 1,6- 二磷酸醛缩酶(fructose-1,6-bisphosphate aldolase, FBA) 是卡尔文循环(Calvin)中重要的酶, 是控制光合作用速率的重要酶之一。在植物中有两种在结构上有一定同源性的果糖 1,6-二磷酸醛缩酶的异构型, 即叶绿体型和胞质型。

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 $\alpha$ -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:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液一	液体 50mL×1 瓶	4℃ 保存	
提取液二	液体 50mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	液体 $\mu$ L×1 支	-20℃ 保存	用前甩几下或离心使试剂落入底部, 再加 2.1mL 蒸馏水溶解备用。
试剂二	粉剂 mg×4 支	-20℃ 保存	用前甩几下或离心使试剂落入底部, 每支加 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 $\mu$ L×1 支	-20℃ 保存	用前甩几下或离心使试剂落入底部, 再加 2.2mL 蒸馏水溶解备用。
试剂四	液体 30mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂五	粉剂 mg×1 支	4℃ 保存	用前甩几下或离心使试剂落入底部, 再加 4.2mL 蒸馏水溶解备用。

## 三、所需的仪器和用品:

紫外分光光度计、1mL 石英比色皿 (光径 1cm)、可调式移液器、天平、震荡仪、低温离心机、研钵。

## 四、植物果糖 1,6-二磷酸醛缩酶 (FBA) 活性测定:

## 1、样本制备:

① 总FBA酶提取: 建议称取约0.1g样本, 加入1mL提取液二进行冰浴匀浆, 于4℃, 13000rpm 离心5min, 取上清液测定。

② 胞浆和叶绿体 FBA 酶分离:

称取约0.2g样本, 加入1mL提取液一, 快速冰浴匀浆后于4℃, 1600rpm离心5min, 弃沉淀, 取上清再4℃, 5000rpm离心15min, 取上清用于测定胞浆FBA酶活性, 取沉淀加1mL提取液二, 强力涡旋震荡15s, 置于冰上(或冰箱)孵育15min, 在4℃, 13000rpm离心5min, 取上清测定叶绿体中FBA酶活性。提示: 整个叶绿体的提取过程须保持4℃低温环境。

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。

【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、上机检测:

① 紫外分光光度计预热 30min, 调节波长至 340nm, 设定温度 25℃, 蒸馏水调零。

- 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：

试剂名称（ $\mu\text{L}$ ）	测定管
样本	50
试剂一	40
试剂二	40
试剂三	40
试剂四	480
试剂五	80
轻轻混匀，室温（25℃）条件下，于 340nm 处测定，2min 时读取 A1，15min 后读取 A2， $\Delta A = A1 - A2$ 。	

- 【注】1. 若  $\Delta A$  值在零附近，可适当延长反应时间 T（如由 15min 增至 25min 后读取 A2），或增加样本加样体积 V1（如由 50 $\mu\text{L}$  增至 100 $\mu\text{L}$ ，则试剂四相应减少），则改变后的 T 和 V1 需代入公式重新计算。
2. 若下降趋势不稳定，可以每隔 30S 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，则起始值相对会偏高），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  $\Delta A$  值大于 0.5，则需减少反应时间（如由 15min 减至 5min 后读取 A2），或减少样本量（如由 50 $\mu\text{L}$  减至 20 $\mu\text{L}$ ，则试剂四相应增加），则改变后的反应时间 T 和样本量 V1 需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。

$$\text{FBA}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T = 156.5 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

### 2、按照样本质量计算：

酶活定义：每克组织每分消耗 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{FBA}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T = 156.5 \times \Delta A \div W$$

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

d---比色皿光径，1cm；

V---加入提取液体积，1mL；

V1---加入样本体积，0.05mL；

V2---反应体系总体积，0.73mL= $7.3 \times 10^{-4}\text{L}$ ；

T---反应时间，15 min；

W---样本质量，g

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。