

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 α -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°C保存	
提取液二	液体 50mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	液体 μ L×1 支	-20°C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。用不完的液体试剂可分装后-20°C保存, 尽量避免反复冻融。
试剂二	粉剂 mg×4 支	-20°C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°C保存, 禁止反复冻融, 三天内用完。。
试剂三	液体 μ L×1 支	-20°C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。用不完的液体试剂可分装后-20°C保存, 尽量避免反复冻融。
试剂四	液体 30mL×1 瓶	4°C保存	
试剂五	粉剂 mg×1 支	4°C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、水浴锅、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°C, 13000rpm离心5min, 取上清液测定。

② 胞浆和叶绿体 FBA 酶的分离:

称取约0.2g样本, 加入1mL提取液一, 快速冰浴匀浆后于4°C, 1600rpm离心5min, 弃沉淀, 取上清再4°C, 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°C, 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°C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 试剂解冻至室温（25℃），或可放在 25℃ 条件下水浴 5-15min。
- ③ 试剂一和二和三和四和五可按照 40:40:40:480:80 比例配成混合液（一枪加 680μL 该混合液）（该混合液用多少配多少，现配现用）。
- ④ 在 1mL 石英比色皿（光径 1cm）中依次加入：

试剂名称 (μL)	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， $\Delta A = A1 - A2$ 。	

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。

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

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。

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

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，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， $0.73\text{mL} = 7.3 \times 10^{-4}\text{L}$ ；

T---反应时间，15min；

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。