

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: G0603W 微板法 96 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 100mL×1 瓶	4°C保存	
提取液二	液体 100mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	液体 μ L×1 支	-20°C保存	使用前甩几下或离心使试剂落入底部,再加 1.1mL 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	使用前甩几下或离心使试剂落入底部,每支加 0.3mL 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	使用前甩几下或离心使试剂落入底部,再加 1.1mL 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。
试剂四	液体 15mL×1 瓶	4°C保存	
试剂五	粉剂 mg×1 支	4°C保存	使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。

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、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 酶标仪预热 30min，调节波长至 340nm，设定温度 25℃。
- 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 10:10:10:130:20 比例配成混合液（一枪加 180μL 该混合液）（该混合液用多少配多少，现配现用）。
- ④ 在 96 孔板中依次加入：

试剂名称（μL）	测定管
样本	20
试剂一	10
试剂二	10
试剂三	10
试剂四	130
试剂五	20

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。

$$FBA(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot})=[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (V1 \times Cpr) \div T = 214.4 \times \Delta A \div Cpr$$

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。

$$FBA(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重})=[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T = 214.4 \times \Delta A \div W$$

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，0.5cm；

V ---加入提取液体积，1mL；

$V1$ ---加入样本体积，0.02mL；

$V2$ ---反应体系总体积， $0.2\text{mL} = 2 \times 10^{-4}\text{L}$ ；

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。