

植物果糖1,6-二磷酸醛缩酶 (FBA) 试剂盒说明书

(货号: ADS-W-GH003 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 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。
试剂二	粉剂 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 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。
试剂四	液体 15mL×1 瓶	4°C保存	
试剂五	粉剂 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、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°C。

② 所有试剂解冻至室温 (25°C) 。

③ 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， $\Delta A = A1 - A2$ 。	

- 【注】** 1. 若 ΔA 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 20μL 增至 60μL，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 20S 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 ΔA 值大于 0.5，需减少反应时间 T（如由 15min 减至 5min 后读取 A2），或减少样本加样体积 V1（如由 20μL 减至 5μL，则试剂四相应增加），则改变后的 T 和 V1 需代入公式重新计算。

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。

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

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，0.2mL= 2×10^{-4} 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。