

## 植物果糖1,6-二磷酸醛缩酶（FBA）试剂盒说明书

（货号：ADS-F-GH003 紫外分光法 48 样 有效期：3 个月）

### 一、指标介绍：

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：

| 试剂组分 | 试剂规格        | 存放温度   | 注意事项                                                                                      |
|------|-------------|--------|-------------------------------------------------------------------------------------------|
| 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 1 瓶      | -20℃保存 | 1. 开盖前注意使试剂落入底部（可手动甩一甩）；<br>2. 加入 2.1mL 蒸馏水溶解备用；<br>3. 保存周期与试剂盒有效期相同。                     |
| 试剂二  | 粉剂 4 支      | -20℃保存 | 每支：<br>1. 临用前 8000g 4℃离心 2min 使试剂落入管底；<br>2. 加入 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 1 瓶      | -20℃保存 | 1. 开盖前注意使试剂落入底部（可手动甩一甩）；<br>2. 加入 2.2mL 蒸馏水溶解备用；<br>3. 保存周期与试剂盒有效期相同。                     |
| 试剂四  | 液体 30mL×1 瓶 | 4℃保存   |                                                                                           |
| 试剂五  | 粉剂 1 瓶      | 4℃保存   | 1. 开盖前注意使试剂落入底部（可手动甩一甩）；<br>2. 加入 4.2mL 蒸馏水溶解备用；<br>3. 保存周期与试剂盒有效期相同。                     |

### 三、实验器材：

研钵（匀浆机）、冰盒（制冰机）、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅（烘箱、培养箱、金属浴）、1ml 石英比色皿、离心管、紫外分光光度计、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

### 四、指标测定：

#### 1、样本提取：

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℃，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、检测步骤：

- 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：

| 试剂组分（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，<br>$\Delta A = A1 - A2$ 。 |     |

- 【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 50μL 增至 100μL，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 50μL 减至 20μL，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。

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

### 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。

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

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

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, 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。

