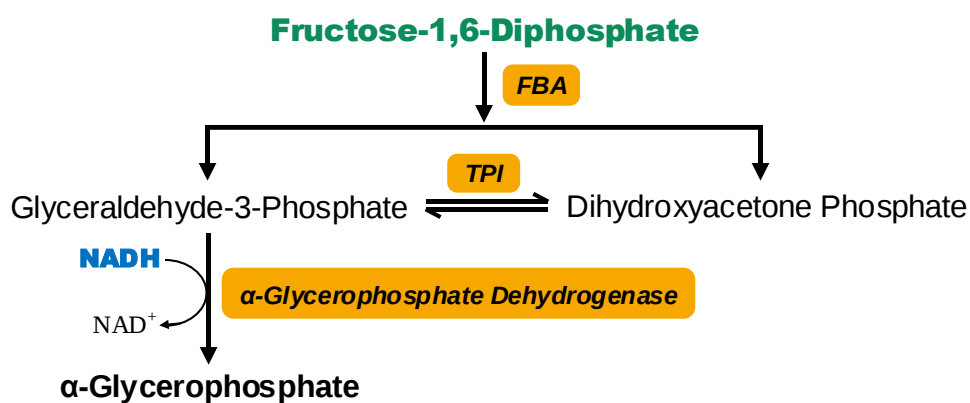




果糖-1,6-二磷酸醛缩酶 (FBA) 活性检测试剂盒

Fructose-1,6-Biphosphate Aldolase (FBA) Activity Assay Kit



北京盒子生工科技有限公司
Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.



果糖-1,6-二磷酸醛缩酶 (FBA) 活性检测试剂盒

Fructose-1,6-Biphosphate Aldolase (FBA) Activity Assay Kit

一、产品描述

果糖 1,6-二磷酸醛缩酶 (FBA) 广泛存在于动植物及微生物体内, 能够催化果糖 1,6-二磷酸可逆的裂解为磷酸二羟丙酮和 3-磷酸甘油醛, 作为糖酵解、糖异生、磷酸戊糖途径及光合作用中参与 Calvin 循环的重要酶, 并在各种逆境胁迫下表现不同的响应。

果糖 1,6-二磷酸醛缩酶催化果糖 1,6-二磷酸生成 3-磷酸甘油醛和磷酸二羟丙酮, 在磷酸丙糖异构酶和 α -磷酸甘油脱氢酶作用下催化 NADH 和磷酸二羟丙酮生成 NAD 和 α -磷酸甘油, NADH 在 340 nm 处具有特征吸收峰, 通过吸光值变化即可表征果糖 1,6-二磷酸醛缩酶的活性。

二、产品内容

名称	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液 A	液体 60 mL×1 瓶	4°C 保存	-
提取液 B	液体 60 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂一	液体 30 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂二	粉剂×1 瓶	-20°C 保存	使用前加入 8.33 mL 蒸馏水充分溶解 (分装后-20°C可保存 1 个月, 避免反复冻融)
试剂三	粉剂×1 瓶	4°C 保存	使用前加入 6 mL 蒸馏水充分溶解 (分装后-20°C可保存 1 个月, 避免反复冻融)
试剂四	液体×1 瓶	4°C 保存	使用前加入 6 mL 蒸馏水充分溶解 (分装后-20°C可保存 1 个月, 避免反复冻融)
试剂五	液体×1 瓶	-20°C 保存	使用前加入 6 mL 蒸馏水充分溶解 (分装后-20°C可保存 1 个月, 避免反复冻融)

三、产品使用说明

测定过程中所需要的仪器和试剂: 紫外分光光度计、1 mL 石英比色皿 (光径 10 mm)、研钵/匀浆器、可调式移液器、台式离心机、恒温水浴/培养箱和蒸馏水。

1. 粗酶液的制备 (可根据预实验结果适当调整样本量及比例)

1.1 总 FBA 酶的提取

①组织: 按照组织质量 (g): 提取液 A 体积 (mL) 为 1: (5-10) 的比例 (建议称取 0.1 g 组织, 加入 1 mL 提取液 A) 处理样品, 冰浴匀浆, 4°C 8000 g 离心 10 min, 取上清置于冰上待测。

②细菌或细胞：离心收集细菌或细胞至离心管内，按照细菌或细胞数量 (10^4 个)：提取液 A 体积 (mL) 为 (500-1000)：1 的比例（建议 500 万细菌或细胞加入 1 mL 提取液 A），冰浴超声破碎（功率 300 W，超声 3 s，间隔 7 s，总时间 3 min），4°C 8000 g 离心 10 min，取上清置于冰上待测。

③液体样本：直接测定或适当稀释后再进行测定。

1.2 胞浆和叶绿体 FBA 酶的提取

①植物组织：按照植物组织质量 (g)：提取液 A 体积 (mL) 为 1：(5-10) 的比例（建议称取 0.1 g 样本，加入 1 mL 提取液 A）处理样品，快速研磨或匀浆，4°C 200 g 离心 5 min，取上清；

②将步骤①中离心上清液置于另一离心管中，4°C 8000 g 离心 10 min；

③步骤②中上清液即可用于胞浆 FBA 酶活性的测定；

④取步骤②中离心沉淀加入 1 mL 提取液 B，振荡溶解后冰浴超声破碎（功率 200 W，超声 3 s，间歇 7 s，总时间 1 min），4°C 8000 g 离心 10 min，取上清即可用于叶绿体中 FBA 酶活性的测定。

注：建议测定总 FBA 酶活性，按照步骤 1.1 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 1.2 提取粗酶液。

2. 测定步骤

①分光光度计预热 30 min 以上，调节波长至 340 nm，蒸馏水调零。

②使用前根据使用量取出试剂一，37°C 预热 10 min 以上。

③在 1 mL 石英比色皿中依次加入下列试剂：

试剂	测定组 (μ L)	空白组 (μ L)
试剂一	500	500
试剂二	100	100
试剂三	100	100
试剂四	100	100
试剂五	100	100
粗酶液	100	-
蒸馏水	-	100

吸光值测定：①充分混匀并立即开始计时，测定 10 s（总时间）时 340nm 处吸光值，记为 A1 测定和 A1 空白；②37°C 准确反应 300 s，测定 310 s（总时间）时 340 nm 处吸光值，记为 A2 测定和 A2 空白；③计算 ΔA 测定 = A1 测定 - A2 测定， ΔA 空白 = A1 空白 - A2 空白， $\Delta A = \Delta A$ 测定 - ΔA 空白。注：空白组只需测定 1-2 次。

3.果糖-1,6-二磷酸醛缩酶（FBA）活性计算

①按组织蛋白浓度计算

单位定义：每 mg 组织蛋白每分钟消耗 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{FBA (U/mg prot)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times 10^9}{\epsilon \times d \times V_{\text{样}} \times \text{Cpr} \times T} = \frac{321.54 \times \Delta A}{\text{Cpr}}$$

②按组织样本质量计算

单位定义：每 g 组织每分钟消耗 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{FBA (U/mg prot)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{样总}} \times 10^9}{\epsilon \times d \times V_{\text{样}} \times W \times T} = \frac{321.54 \times \Delta A}{W}$$

③按细菌或细胞数量计算

单位定义：每 10^4 个细菌或细胞每分钟消耗 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{FBA (U/10}^4\text{ cell)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{样总}} \times 10^9}{\epsilon \times d \times V_{\text{样}} \times \text{细菌或细胞数量} \times T} = \frac{321.54 \times \Delta A}{\text{细菌或细胞数量}}$$

④按液体样本体积计算

单位定义：每 mL 液体样本每分钟消耗 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{FBA (U/mL)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times 10^9}{\epsilon \times d \times V_{\text{样}} \times T} = 321.54 \times \Delta A$$

注释： V 样：反应体系中加入粗酶液的体积，0.1 mL；V 样总：粗酶液总体积，1 mL；V 反总：反应体系总体积， 1×10^{-3} L； ϵ ：NADH 摩尔消光系数， 6.22×10^3 L/mol/cm；d：1 mL 石英比色皿光径，1 cm；T：反应时间，300 s=5 min；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；W：样本质量，g； 10^9 ：单位换算系数，1 mol= 10^9 nmol。

四、注意事项

- ①若 ΔA 大于 0.8，建议将粗酶液使用相应提取液适当稀释后再进行测定，计算时相应修改；
- ②测定植物样本时，建议在提取完成后 2 h 内完成检测，若样本量过大，建议分批提取和检测；
- ③提取液 A 中含有约 0.5 mg/mL 的蛋白，测定样品蛋白浓度时需减去提取液本身的蛋白含量；
- ④可以将试剂一、二、三、四、五按照 5:1:1:1:1 的体积比配制为工作液使用（现配现用）；
- ⑤为保证结果准确且避免试剂损失，测定前请仔细阅读说明书（以实际收到说明书内容为准），确认试剂储存和准备是否充分，操作步骤是否清楚，且务必取 2-3 个预期差异较大的样本进行预测定，过程中问题请您及时与工作人员联系。

For Research Use Only. Not for Use in Diagnostic Procedures.

