

## 果糖-1,6-二磷酸醛缩酶 (FBA) 检测试剂盒 (UV板,微量法)

产品货号: BA1140

产品规格: 100管/96样

### 产品简介:

果糖1,6-二磷酸醛缩酶 (Fructose 1,6 bisphosphate aldolase, FBA) (EC4.1.2.13) 是糖酵解、糖异生、磷酸戊糖途径及光合作用中参与calvin循环的重要酶,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,广泛存在于动植物及微生物体内,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 $\alpha$ -磷酸甘油脱氢酶作用下催化NADH和磷酸二羟丙酮生成NAD和 $\alpha$ -磷酸甘油,340nm处吸光值的变化可反映果糖1,6-二磷酸醛缩酶活性的高低。

**注意: 实验之前建议选择2-3个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。**

### 产品组成:

试剂名称	规格	保存条件
提取液一	液体110mL×1瓶	2-8℃
提取液二	液体110mL×1瓶	2-8℃
试剂一	液体10mL×1瓶	2-8℃
试剂二	粉剂×1瓶	-20℃
试剂三	粉剂×1瓶	2-8℃
试剂四	液体×1支	2-8℃
试剂五	液体×1支	-20℃

### 溶液的配制:

1. 试剂二: 临用前加入2mL蒸馏水充分溶解,用不完的试剂分装后-20℃保存,禁止反复冻融;
2. 试剂三: 临用前加入2mL蒸馏水充分溶解,用不完的试剂分装后-20℃保存,禁止反复冻融;
3. 试剂四: 液体置于试剂瓶内EP管中。临用前加入2mL蒸馏水充分溶解,用不完的试剂分装后-20℃保存,禁止反复冻融;
4. 试剂五: 液体置于试剂瓶内EP管中。临用前加入2mL蒸馏水充分溶解,用不完的试剂分装后-20℃保存,禁止反复冻融。

### 试验中所需的仪器和试剂:

紫外分光光度计/酶标仪、天平、低温离心机、微量石英比色皿/96孔UV板、可调式移液枪、研钵/匀浆器、漩涡震荡仪、超声破碎仪、冰。

### 操作步骤 (仅供参考):

#### 一、样品处理 (可适当调整待测样本量,具体比例可以参考文献)

##### ①总 FBA 酶:

组织: 按照组织质量 (g): 提取液体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液一) 充分冰浴匀浆, 然后 8000g, 4℃, 离心 10min, 取上清置于冰上待测。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

QQ: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com

细菌或细胞：按照细菌或细胞数量（ $10^4$ 个）：提取液体积（mL）为 500~1000: 1 的比例（建议 500 万细胞加入 1mL 提取液一），冰浴超声波破碎细菌或细胞（功率 300w，超声 3 秒，间隔 7 秒，总时间 3min）；然后 8000g，4℃，离心 10min，取上清置于冰上待测。

液体：直接检测。

## ②胞浆和叶绿体 FBA 酶 的分离：

(1) 按照植物组织质量（g）：提取液体积(mL)为 1: 5-10 的比例（建议称取约 0.1g 样本，加入 1mL 提取液一），手工快速研磨或匀浆，之后于 4℃，200g 离心 5min；

(2) 弃沉淀，取上清在 4℃，8000g 离心 10min（离心时缓慢加速和降速）；

(3) 取上清用于测定胞浆 FBA 酶活性，取沉淀加 1mL 提取液二，震荡溶解后超声破碎（冰浴，200W，破碎 3s，间歇 7s，总时间 1min），然后 4℃，8000g 离心 10min，上清即为叶绿体中 FBA 酶活性。

**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。**

## 二、测定步骤

1. 分光光度计/酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 340nm，蒸馏水调零。

2. 样本测定：(在微量石英比色皿/96 孔 UV 板中分别加入下列试剂)。

试剂名称（ $\mu$ L）	测定管	空白管
试剂一	100	100
试剂二	20	20
试剂三	20	20
试剂四	20	20
试剂五	20	20
样本	20	-
蒸馏水	-	20

充分混匀后于 340nm 处测定 10s 时的吸光值 A1，迅速置于 37℃（哺乳动物）或 25℃（其他物种）水浴 5min（有控温功能的酶标仪可以将温度调至 37℃或者 25℃），拿出迅速擦干测定 310s 时的吸光值 A2，分别记为 A1 测定、A2 测定、A1 空白和 A2 空白，计算  $\Delta A$  测定管=A1 测定-A2 测定， $\Delta A$  空白管=A1 空白-A2 空白， $\Delta A = \Delta A$  测定管- $\Delta A$  空白管。（空白管只需做 1-2 次）

**注意：**如果检测样本量大，可以将试剂一、二、三、四、五按照 5:1:1:1:1（V:V:V:V:V）的比例配成工作液待用（现配现用）。

## 三、FBA 含量计算

### A、按微量石英比色皿计算：

(1) 按蛋白浓度计算

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

$$\text{FBA 酶活 (U/mg prot)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V \text{ 反总} \div (V \text{ 样} \times C_{\text{pr}}) \div T = 321.54 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

(2) 按样本质量计算

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

$$\text{FBA 酶活 (U/g 质量)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V \text{ 反总} \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 321.54 \times \Delta A \div W$$

(3) 按照细胞或细菌数量计算

酶活单位定义：每  $10^4$  个细胞或细菌每分钟消耗 1nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{FBA 酶活 (U/10}^4\text{cell)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V \text{ 反总} \div (V \text{ 样} \times \text{细胞数量} \div V \text{ 样总}) \div T = 321.54 \times \Delta A \div \text{细胞数量 (万个)}$$

(4) 按液体体积计算



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com

酶活单位定义：每 mL 液体每分钟消耗 1nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

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

V 反总：反应体系总体积， $2 \times 10^{-4}$ L； $\epsilon$ ：NADH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3$ L/mol/cm；d：比色皿光径，1cm；V 样：加入样本体积，0.1mL；V 样总：加入提取液体积，1mL；T：反应时间，5min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL，蛋白浓度自行测定；W：样本质量，g； $10^9$ ：单位换算系数， $1\text{mol} = 10^9\text{nmol}$ 。

#### B、按 96 孔 UV 板计算：

将上述公式中的 d-1cm 改为 d-0.6cm（96 孔板光径）进行计算即可。

#### 注意事项：

1. 若  $\Delta A$  大于 0.8 建议将样本用相应提取液进行适当的稀释再进行测定，并在计算公式中乘以稀释倍数。
2. 若是植物样本，建议在提取完成后 2h 内检测完，如果样本量过大，建议分批提取、检测。
3. 由于提取液一中含有一定浓度的蛋白（约 0.5mg/mL），所以在测定样品蛋白浓度是需要减去提取液本身的蛋白含量。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q：807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com