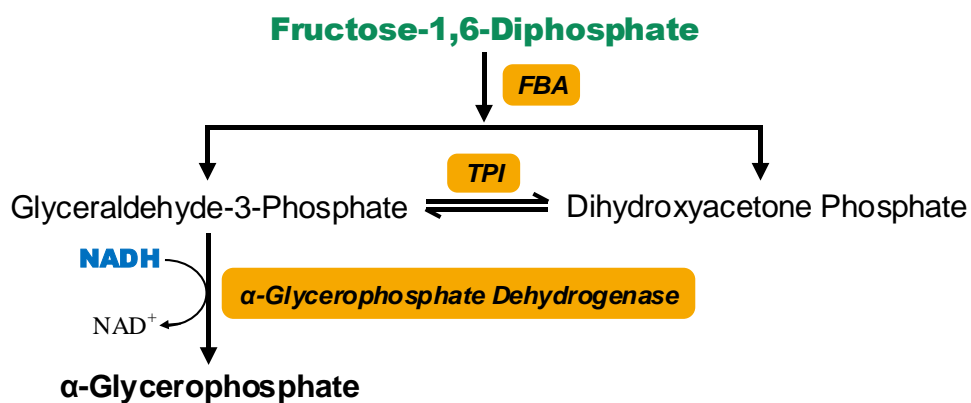




果糖-1,6-二磷酸醛缩酶 (FBA) 活性检测试剂盒  
Fructose-1,6-Biphosphate Aldolase (FBA) Activity Assay Kit



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  $\alpha$ -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, 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 110 mL×1 瓶	4°C 保存	-
提取液 B	液体 110 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂一	液体 12 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂二	粉剂×1 瓶	-20°C 保存	使用前加入 4 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 3 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 2.5 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 2.5 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/酶标仪、微量石英比色皿 (光径 10 mm) /96 孔 UV 板、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：直接检测或适当稀释后再进行检测。

## 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分光光度计或酶标仪预热 30 min 以上，调节波长至 340 nm，蒸馏水调零。

②在 96 孔 UV 或微量石英比色皿中依次加入下列试剂：

试剂	测定组 ( $\mu\text{L}$ )	空白组 ( $\mu\text{L}$ )
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
粗酶液	20	-
蒸馏水	-	20

**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 (哺乳动物) 或 25°C (其他物种) 准确反应 300 s 后，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  $\Delta A$  测定 = A1 测定 - A2 测定， $\Delta A$  空白 = A1 空白 - A2 空白， $\Delta A = \Delta A$  测定 -  $\Delta A$  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

#### 3.1 按 96 孔 UV 板测定的计算公式

##### 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。

$$\text{FBA (U/mg prot)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times 10^9}{\varepsilon \times d_1 \times V_{\text{样}} \times \text{Cpr} \times T} = \frac{643 \times \Delta A}{\text{Cpr}}$$

##### 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。

$$\text{FBA (U/g)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{样总}} \times 10^9}{\varepsilon \times d_1 \times V_{\text{样}} \times W \times T} = \frac{643 \times \Delta A}{W}$$

##### 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。

$$\text{FBA (U/10}^4 \text{ cell)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{样总}} \times 10^9}{\varepsilon \times d_1 \times V_{\text{样}} \times \text{细菌或细胞数量} \times T} = \frac{643 \times \Delta A}{\text{细菌或细胞数量}}$$

##### 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。

$$\text{FBA (U/mL)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times 10^9}{\varepsilon \times d_1 \times V_{\text{样}} \times T} = 643 \times \Delta A$$

#### 3.2 按微量石英比色皿测定的计算公式

将计算公式中 96 孔 UV 板光径 ( $d_1=0.5$  cm) 改为微量石英比色皿光径 ( $d_2=1$  cm) 计算即可。

**注释：**  $V_{\text{样}}$ ：反应体系中加入粗酶液的体积，0.02 mL； $V_{\text{样总}}$ ：粗酶液总体积，1 mL； $V_{\text{反总}}$ ：反应体系总体积， $2 \times 10^{-4}$  L； $\varepsilon$ ：NADH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3$  L/mol/cm； $d_1$ ：96 孔 UV 板光径，0.5 cm； $d_2$ ：1 mL 石英比色皿光径，1 cm； $T$ ：反应时间，300 s=5 min； $\text{Cpr}$ ：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<sup>9</sup> nmol。

#### 四、注意事项

- ①若  $\Delta A$  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，测定样品蛋白浓度是需减去提取液本身的蛋白含量；
- ④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。

