

果糖-1,6-二磷酸醛缩酶 (FBA) 检测试剂盒 (紫外分光光度法)

产品货号: BA1139

产品规格: 50管/48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 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, 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60mL×1瓶	2-8℃
提取液二	液体60mL×1瓶	2-8℃
试剂一	液体25mL×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20 μ L×1瓶	2-8℃
试剂五	液体20 μ L×1瓶	-20℃

溶液的配制:

1. 试剂二: 临用前加入5mL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5mL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5mL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5mL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、分析天平、低温离心机、1mL石英比色皿、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



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司
Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址: 上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话: 400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

一) 充分冰浴匀浆, 然后 8000g, 4℃, 离心 10min, 取上清置于冰上待测。

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

2. 样本测定: (在 1mL 石英比色皿中分别加入下列试剂)。

试剂名称 (μL)	测定管	空白管
试剂一	20	20
试剂二	-	-
试剂三	-	-
试剂四	44	40
试剂五	-	4
样本	40	40
蒸馏水	100	100

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, 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 ΔA 测定管=A1 测定-A2 测定, ΔA 空白管=A1 空白-A2 空白, $\Delta A = \Delta A$ 测定管- ΔA 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

(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。

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

(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。

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



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司
 Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址: 上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话: 400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

(4) 按液体体积计算

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。

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

V 反总：反应体系总体积，0.001L； ε ：NADH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3 \text{L/mol/cm}$ ；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， $1\text{mol}=10^9\text{nmol}$ 。

注意事项：

1. 若 ΔA 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

上海尚宝生物科技有限公司
Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱：saintbio@126.com

<http://www.saint-bio.com>