

果糖-1,6-二磷酸醛缩酶（FBA）活性检测试剂盒说明书

紫外分光光度法

注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。

货号：BC2270

规格：50T/48S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液一	液体 60 mL×1 瓶	2-8℃保存
提取液二	液体 60 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 30 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	粉剂×1 瓶	-20℃保存
试剂三	粉剂×1 瓶	2-8℃保存
试剂四	液体×1 瓶	2-8℃保存
试剂五	液体×1 瓶	-20℃保存

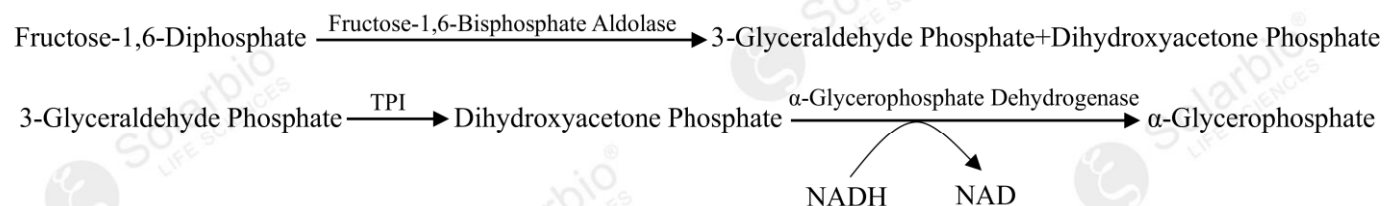
溶液的配制：

- 1、试剂二：临用前加入 8.33 mL 蒸馏水充分溶解，用不完的试剂分装后-20℃保存 4 周，禁止反复冻融；
- 2、试剂三：临用前加入 6 mL 蒸馏水充分溶解，用不完的试剂分装后-20℃保存 4 周，禁止反复冻融；
- 3、试剂四：液体置于试剂瓶内 EP 管中，使用前离心至底部。临用前加入 6 mL 蒸馏水充分溶解，用不完的试剂分装后-20℃保存 4 周，禁止反复冻融；
- 4、试剂五：液体置于试剂瓶内 EP 管中，使用前离心至底部。临用前加入 6 mL 蒸馏水充分溶解，用不完的试剂分装后-20℃保存 4 周，禁止反复冻融。

产品说明：

果糖 1,6-二磷酸醛缩酶（Fructose 1,6 biphosphate aldolase, FBA）（EC.4.1.2.13）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。





需自备的仪器和用品:

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/细胞超声破碎仪、漩涡振荡仪、冰和蒸馏水。

操作步骤:

一、样本处理 (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°C, 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°C, 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°C, 200g 离心 5min;

(2) 弃沉淀, 取上清在 4°C, 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°C, 8000g 离心 10min, 上清即为叶绿体中 FBA 酶活性。

注: 1. 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。

2. 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 (推荐使用双缩脲法测蛋白, 不推荐使用 BCA 法)。

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、根据样本量取部分试剂一 37°C 预热 10min。

3、样本测定: (在 1mL 石英比色皿中分别加入下列试剂)

	测定管	空白管
试剂一 (μL)	500	500
试剂二 (μL)	100	100
试剂三 (μL)	100	100
试剂四 (μL)	100	100
试剂五 (μL)	100	100
样本 (μL)	100	-
蒸馏水 (μL)	-	100

充分混匀后于 340nm 处测定 10s 时的吸光值 A1, 迅速置于 37°C 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 $\Delta A_{\text{测定管}} = A1_{\text{测定}} - A2_{\text{测定}}$, $\Delta A_{\text{空白管}} = A1_{\text{空白}} - A2_{\text{空白}}$, $\Delta A = \Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}$ 。空白管只需做 1-2 次。注: 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酶活计算

(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。

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

(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。

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

(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。

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

V 反总：反应体系总体积，0.001L； ϵ ：NADH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$ ；d：1mL 石英比色皿光径，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；N：细胞数量，以万计； 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。

实验实例：

- 1、取 0.1g 小鼠肝脏加入 1mL 提取液进行匀浆研磨，取上清稀释 8 倍后按照测定步骤操作，测得计算 ΔA 测定管 = A1 测定 - A2 测定 = 1.257 - 1.06 = 0.197， ΔA 空白管 = A1 空白 - A2 空白 = 1.164 - 1.16 = 0.004， $\Delta A = \Delta A$ 测定管 - ΔA 空白管 = 0.197 - 0.004 = 0.193，按样本质量计算酶活：
FBA 酶活 (U/g 质量) = $321.54 \times \Delta A \div W \times 8$ (稀释倍数) = $321.54 \times 0.193 \div 0.1 \times 8$ (稀释倍数) = 4964 U/g 质量。
- 2、取 0.1g 绿萝加入 1mL 提取液进行匀浆研磨，取上清后按照测定步骤操作，测得计算 ΔA 测定管 = A1 测定 - A2 测定 = 1.438 - 1.386 = 0.052， ΔA 空白管 = A1 空白 - A2 空白 = 1.164 - 1.16 = 0.004， $\Delta A = \Delta A$ 测定管 - ΔA 空白管 = 0.052 - 0.004 = 0.048，按样本质量计算酶活：
FBA 酶活 (U/g 质量) = $321.54 \times \Delta A \div W$ = $321.54 \times 0.048 \div 0.1$ = 154.3392 U/g 质量。

相关发表文献：

- [1] Chen H, Wang Q, Fan M, Zhang X, Feng P, Zhu L, Wu J, Cheng X, Wang J. A Single Nucleotide Variation of CRS2 Affected the Establishment of Photosynthetic System in Rice. *Int J Mol Sci.* 2023 Mar 18;24(6):5796. doi: 10.3390/ijms24065796. PMID: 36982870; PMCID: PMC10054620.
- [2] Nazarbek G, Kutzhanova A, Nurtay L, Mu C, Kazybay B, Li X, Ma C, Amin A, Xie Y. Nano-evolution and protein-based enzymatic evolution predicts novel types of natural product nanozymes of traditional Chinese medicine: cases of herbzymes of Taishan-Huangjing (*Rhizoma polygonati*) and Goji (*Lycium chinense*). *Nanoscale Adv.* 2021 Aug





12;3(23):6728-6738. doi: 10.1039/d1na00475a. PMID: 36132653; PMCID: PMC9418865.

[3] Jiang X, Zhu L, Zhan D. Deletion of lacD gene affected stress tolerance and virulence of *Streptococcus suis* serotype 2. *J Microbiol.* 2022 Sep;60(9):948-959. doi: 10.1007/s12275-022-2146-4. Epub 2022 Aug 19. PMID: 35984615.

[4] Xia J, Xin W, Wang F, Xie W, Liu Y, Xu J. Cloning and Characterization of Fructose-1,6-Bisphosphate Aldolase from *Euphausia superba*. *Int J Mol Sci.* 2022 Sep 9;23(18):10478. doi: 10.3390/ijms231810478. PMID: 36142390.

[5] Yang Q, Cai D, Chen W, Chen H, Luo W. Combined metabolic analyses for the biosynthesis pathway of l-threonine in *Escherichia coli*. *Front Bioeng Biotechnol.* 2022 Sep 9; 10:1010931. doi: 10.3389/fbioe.2022.1010931. PMID: 36159692; PMCID: PMC9500239.

相关系列产品:

BC2240/BC2245 果糖-1,6-二磷酸 (FDP) 含量检测试剂盒

BC0530/BC0535 磷酸果糖激酶 (PFK) 活性检测试剂盒

