

果糖-1,6-二磷酸醛缩酶（FBA）活性检测试剂盒说明书

微量法

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：BC2275

规格：100T/96S

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 110 mL×1 瓶	2-8℃保存
提取液二	液体 110 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 12 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	粉剂×1 支	-20℃保存
试剂三	粉剂×1 支	2-8℃保存
试剂四	液体×1 支	2-8℃保存
试剂五	液体×1 支	-20℃保存

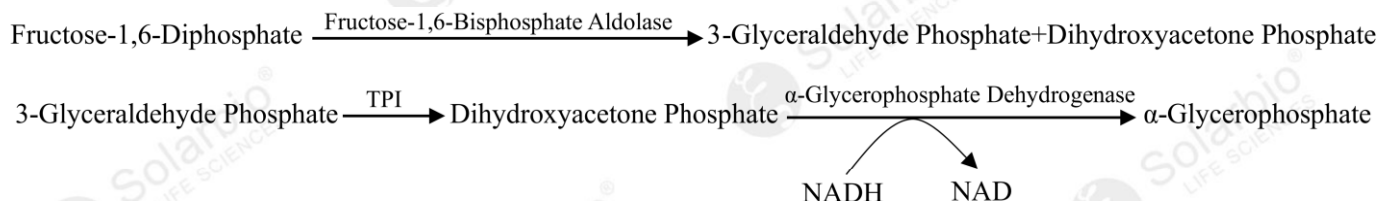
溶液的配制：

- 1、试剂二：临用前加入 4 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 3 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 2.5 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 2.5 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 bisphosphate 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/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/细胞超声破碎仪、漩涡震荡仪、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℃, 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。

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

2、根据样本量取部分试剂一37℃预热10min。

3、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)

	测定管	空白管
试剂一(μL)	100	100
试剂二(μL)	20	20
试剂三(μL)	20	20
试剂四(μL)	20	20
试剂五(μL)	20	20
样本(μL)	20	-
蒸馏水(μL)	-	20

充分混匀后于340nm处测定10s时的吸光值A1, 迅速置于37℃水浴5min(有控温功能的酶标仪可以将温度调至37℃), 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 酶活计算

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 10⁴ 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，2×10⁻⁴L；ε：NADH 摩尔消光系数，6.22×10³L/mol/cm；d：微量石英比色皿光径，1cm；V 样：加入样本体积，0.02mL；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；10⁹：单位换算系数，1mol=10⁹nmol。

B、按 96 孔 UV 板计算：

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

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，使用微量石英比色皿测得计算 ΔA 测定管=A1 测定-A2 测定=1.3061-1.125=0.1811，ΔA 空白管=A1 空白-A2 空白=1.1983-1.1858=0.0125，ΔA=ΔA 测定管-ΔA 空白管=0.1811-0.0125=0.1686，按样本质量计算酶活：
 FBA 酶活 (U/g 质量) = 321.54 × ΔA ÷ W × 8 (稀释倍数) = 321.54 × 0.1686 ÷ 0.1 × 8 (稀释倍数) = 4337 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，使用微量石英比色皿测得计算 ΔA 测定管=A1 测定-A2 测定=1.4458-1.37=0.0758，ΔA 空白管=A1 空白-A2 空白=1.1983-1.1858=0.0125，ΔA=ΔA 测定管-ΔA 空白管=0.0758-0.0125=0.0633，按样本质量计算酶活：
 FBA 酶活 (U/g 质量) = 321.54 × ΔA ÷ W = 321.54 × 0.0633 ÷ 0.1 = 204 U/g 质量。

相关发表文献：

[1] Bai Y, Ren C, Hou C, Chen L, Wang Z, Li X, Zhang D. Phosphorylation and acetylation responses of glycolytic enzymes in meat to different chilling rates. Food Chem. 2023 Sep 30; 421:135896. doi: 10.1016/j.foodchem.2023.135896. Epub 2023 Mar 8. PMID: 37098310.

[2] Li Y, Cai L, Ding T, Tian E, Yan X, Wang X, Zhang J, Yu K, Chen Z. Comparative Transcriptome Analysis Reveals the Molecular Basis of Brassica napus in Response to Aphid Stress. Plants (Basel). 2023 Aug 3;12(15):2855. doi:





10.3390/plants12152855. PMID: 37571009; PMCID: PMC10421284.

[3] 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; PMCID: PMC9499490.

[4] Gao X, Xu S, Mo Y, Zhu Y, Chen X, Miao M, Quan Y, Yu W. Acetylation of fructose-bisphosphate aldolase-mediated glycolysis is essential for *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus infection. *Microb Pathog*. 2022 Sep; 170:105695. doi: 10.1016/j.micpath.2022.105695. Epub 2022 Jul 31. PMID: 35921953.

[5] He X, Zhang J, Sun Y, Lan T, Guo X, Wang X, Kandil OM, Ayaz M, Luo X, Song H, Zheng Y. Characterization of Fructose-1,6-Bisphosphate Aldolase 1 of *Echinococcus multilocularis*. *Vet Sci*. 2021 Dec 23;9(1):4. doi: 10.3390/vetsci9010004. PMID: 35051088; PMCID: PMC8781991.

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

