

doi:10.3969/j.issn.1001-4616.2017.02.013

# 枯草芽孢杆菌醛缩酶的克隆表达、 纯化、酶学性质研究及应用

高 品, 赵 杰, 韦光绪, 殷志敏

(南京师范大学生命科学学院, 生物化学与生物制品研究所, 江苏省分子与医学生物技术重点实验室, 江苏 南京 210023)

**[摘要]** 果糖-1,6 二磷酸醛缩酶是糖酵解途径中的关键酶,可催化果糖-1,6 二磷酸(FDP)分解成磷酸二羟丙酮(DAP)和三磷酸甘油醛(G3P)的可逆反应. 本文首次克隆枯草芽孢杆菌中的果糖-1,6 二磷酸醛缩酶基因(*fb*a),构建原核重组表达载体,利用 Ni-NTA 柱对重组枯草芽孢杆菌果糖-1,6 二磷酸醛缩酶(FBA)进行分离纯化和酶学性质研究,构建表达载体 pET28a(+)-*fb*a 转化入 BL21(DE3)宿主内,在 30 ℃ 下诱导表达,通过 SDS-PAGE 检测 FBA 纯度和分子量,FBA 分子量约为 35 kDa. 最适反应条件为 pH 7.5、35 ℃,金属离子 K<sup>+</sup>、Na<sup>+</sup>、Fe<sup>2+</sup> 对该酶有较好的激活作用,而 Zn<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup>、Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup> 对该酶有一定的抑制作用. 基于 FBA 可专一性分解 FDP 的基本原理,建立了快速、准确测定酵母发酵液中 FDP 含量的单酶法. 通过单酶法测定 FDP 含量的样品回收率为 99.54%,相对标准偏差为 0.427%,测定结果基本不受样品中其他成分干扰. *T* 检验结果表明,单酶法和多酶法对发酵液中 FDP 含量的检测结果无显著差异,与紫外分光光度法测定的结果存在显著差异,这说明单酶法可以准确测定发酵液中 FDP 的含量. 单酶法测定 FDP 含量具有快速、准确、灵敏的特点,不仅适合于成分复杂的发酵液中 FDP 含量的测定,也具有广泛的应用价值.

**[关键词]** FBA,分离纯化,酶学性质,FDP,单酶法

**[中图分类号]** Q819 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1001-4616(2017)02-0076-07

## Expression, Purification, Biochemical Characterization and Application of Recombinant *Bacillus subtilis* Aldolase

Gao Pin, Zhao Jie, Wei Guangxu, Yin Zhimin

(School of Life Sciences, Nanjing Normal University, Institute of Biochemistry and Biological Products,  
Jiangsu Key Laboratory for Molecular and Medical Biotechnology, Nanjing 210023, China)

**Abstract:** Fructose 1, 6-biphosphate aldolase (FBA) is glycolytic enzyme that catalyze the reversible conversion of fructose-1,6-disphosphate(FDP) to glyceraldehyde-3-phosphate(G3P) and dihydroxyacetone phosphate(DAP). A *fb*a gene(*fb*a) from *Bacillus subtilis* encoding a monofunctional FBA was firstly cloned and expressed in *Escherichia coli* (*E. coli*). The recombinant FBA was purified by Ni-NTA column. Protein expression were induced under 30 ℃ and analyzed by 12% SDS-PAGE. The recombinant FBA molecular weight was about 35 kDa. The optimal reaction temperature and pH of this recombinant enzyme were 35 ℃ and 7.5, respectively. Furthermore, the effect of metal ions on recombinant enzyme was determined. K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup> and Fe<sup>2+</sup> could promote the activity of this enzyme while Zn<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> had a strong inhibitory effect on it. Based on the specificity of FBA in catalyzing FDP to G3P and DAP, we set up a method that can be used for determination of FDP concentration in the fermentation broth by using 2,4-dinitrophenylhydrazine(DNPH) as substrate and recombinant FBA as enzyme. Compared with multienzyme method and spectrophotometry method, the result of this method showed that the recovery rate of FDP was 99.54% and the relative standard deviation was 0.427%. *T*-test showed that there was no significant difference between the result of multienzyme method and DNPH-FBA method. This result means that DNPH-FBA method can be used as a fast and simple way to detect FDP concentration in FDP mass production process.

**Key words:** FBA, separation and purification, biochemical characterization, FDP, DNPH-FBA method

收稿日期:2016-12-25.

基金项目:江苏省科技厅前瞻性研究项目(BY2013001-03).

通讯联系人:殷志敏,教授,博士生导师,研究方向:生物化学及细胞生物学. E-mail:yinzhimin@njnu.edu.cn

果糖-1,6-二磷酸(fructose-1,6-diphosphate, FDP)是细胞在糖酵解途径中产生的重要的中间产物之一,其可在细胞中通过调节糖代谢中若干酶的活性产生药理作用<sup>[1]</sup>. FDP 主要用于冠心病、急性心肌梗死、肾功能衰竭、急性脑梗死、肺炎、慢性重症肝炎、神经炎、癫痫等多种疾病的治疗<sup>[2-5]</sup>. 目前, FDP 的生产主要是利用啤酒酵母细胞自身代谢产生<sup>[6]</sup>,但是由于 FDP 在合成积累过程中受到其他代谢物、ATP、NADH 的影响,其合成速率与分解速率较快,当 FDP 积累到足够量时便很快被分解. 所以在 FDP 生产过程中建立一种可快速准确测定 FDP 含量的方法是十分必要的.

我国卫生部颁布的质量标准曾采用二苯胺法,由于其专属性较低,葡萄糖、果糖、果糖-6-磷酸、葡萄糖-6-磷酸等均能干扰测定结果. 紫外分光光度法<sup>[7]</sup>是利用 FDP 在盐酸介质中发生反应生成羟甲基糠醛类物质,可通过 292nm 波长间接测定 FDP 含量,该方法可以实现发酵液中 FDP 含量的快速检测,但是由于发酵液颜色及其他成分的干扰,因此无法实现准确测定. 多酶法<sup>[8]</sup>是利用醛缩酶、磷酸甘油脱氢酶、磷酸丙糖异构酶和还原型辅酶 I 的多酶体系测定 FDP 含量;该方法可以实现 FDP 含量准确测定,但是所需试剂较为昂贵且反应时间较长.

FBA 活性最早于 1934 年被 Meyerhof 等人发现. 根据其催化机制不同可将其分为两大类: I 型 FBA 存在于动物和高等植物中, II 型 FBA 存在于细菌和一些藻类中. FBA 主要功能是在糖酵解过程中催化 FDP 分解成 DAP 和 G3P<sup>[9-12]</sup>.

本研究成功从枯草芽孢杆菌中克隆出果糖-1,6-二磷酸醛缩酶基因,并在大肠杆菌 *Rosetta* (DE3) 中实现 FBA 蛋白的高效表达,经分离纯化获得高活力的重组 FBA 蛋白酶,并通过分光光度法<sup>[13-14]</sup>对 FBA 的酶学性质进行初步探究. 此外,通过多酶法测定的基础上对其进行改进,建立了一种快速准确测定 FDP 含量的单酶法. 单酶法是利用 FBA 对 FDP 的特异性和专一性,通过向待测样品中添加适量的 FBA,使 FDP 完全分解产生 DAP,然后借助 DNPH 与 DAP 缩合成紫红色的苯腙,在 540nm 波长下测定吸收值,即可快速、准确测定 FDP 含量.

综上所述,本研究利用重组 FBA 对发酵液中 FDP 含量测定具有快速、准确的特点,且不需大型仪器设备,测试成本较低. 通过对单酶法测定酵母发酵液中 FDP 含量的样品回收率,测定精确度等进行了研究,并对紫外分光光度法、多酶法及单酶法测定 FDP 含量的结果进行了差异分析,旨在为探讨酵母发酵液中 FDP 含量的快速准确测定方法提供理论依据.

## 1 实验材料和方法

### 1.1 材料

FDPNa<sub>3</sub> 标准品(纯度 ≥99%)、PCR 试剂盒、pH 7.4 Tris-HCl 溶液、DNPH、重组工程菌、浓盐酸、葡萄糖、磷酸氢二钠、还原型辅酶 I、磷酸甘油脱氢酶以及磷酸丙糖异构酶等.

### 1.2 主要仪器

镍柱、全波长紫外分光光度计、微量移液器、分析天平等.

### 1.3 果糖-1,6-二磷酸醛缩酶重组表达与纯化

在 NCBI 中查询到枯草芽孢杆菌醛缩酶基因序列,根据目的基因序列设计引物并引入酶切位点:

上游引物:5'-CGGGATCCATGCCTTTAGTTTCTATG-3'

↑

*Bam*H I

下游引物:5'-GCGTCGACTTAAGCTTGTTTGAAGAAC-3'

↑

*Sal* I

从本实验室保存的枯草芽孢杆菌中提取全基因组作为目的基因扩增的模板,再根据所设计引物进行 PCR(94 °C 20s;57 °C 20s;74 °C 45s;28 个循环)扩增,并将目的基因与载体连接构建重组表达质粒,并转化到 *Rosetta* (DE3) 中,诱导蛋白表达后经 Ni-NTA 柱纯化、透析浓缩获得 FBA 重组蛋白酶. 用试剂盒测定蛋白酶浓度,并放入 -20 °C 保存.

#### 1.4 重组果糖-1,6-二磷酸醛缩酶酶活力测定

根据文献[14]中的FBA酶活测定方法,以果糖-1,6-二磷酸为底物,并偶联FBA、磷酸甘油脱氢酶和丙糖磷酸异构酶,通过检测还原型辅酶I光吸收值的变化来推算FBA活力.反应体系含有:50 mmol/L、pH 7.4的Tris-HCl缓冲液,0.2 mmol/L NADH,50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 磷酸甘油脱氢酶和丙糖磷酸异构酶,适量的FBA酶液和FDP.通过测定340 nm处吸光值的变化,推算出FBA的活力.酶活定义:在上述1 mL反应体系中,每分钟分解1  $\mu\text{mol}$ 的FDP所需的酶量作为一个酶活单位U.

#### 1.5 重组果糖-1,6-二磷酸醛缩酶酶学性质

**FBA最适反应温度:**将缓冲液分别在20  $^{\circ}\text{C}$ 、25  $^{\circ}\text{C}$ 、30  $^{\circ}\text{C}$ 、35  $^{\circ}\text{C}$ 、40  $^{\circ}\text{C}$ 、45  $^{\circ}\text{C}$ 、50  $^{\circ}\text{C}$ 、55  $^{\circ}\text{C}$ 水浴中保温10 min,加入100  $\mu\text{L}$ 磷酸甘油脱氢酶,100  $\mu\text{L}$ 丙糖磷酸异构酶,100  $\mu\text{L}$  FBA,在不同温度下反应5 min,检测340 nm处吸光值的变化,以最高酶活为100%,推算出各温度下的相对酶活.**FBA的热稳定性:**将FBA酶液分别在20  $^{\circ}\text{C}$ 、30  $^{\circ}\text{C}$ 、40  $^{\circ}\text{C}$ 、50  $^{\circ}\text{C}$ 和60  $^{\circ}\text{C}$ 水浴保温1 h,每隔30 min取出一组样品,进行酶活测定,以最高酶活为100%.以酶活力为纵坐标,温度为横坐标.

**FBA最适反应pH值:**以FDP为底物,在pH分别为2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0的缓冲液中,按上述酶活测定方法,进行酶活测定.

**金属离子对FBA酶活力的影响:**将各类金属离子与酶液混合,使其最终浓度分别达到1 mmol/L和8 mmol/L,然后在37  $^{\circ}\text{C}$ 、pH 7.5条件下测定酶活,得到不同浓度的各类金属离子对酶活的影响,以未处理的酶液酶活为100%.

#### 1.6 单酶法测定已知浓度FDP溶液并建立标准曲线

##### 1.6.1 配制标准液

**FDPNa<sub>3</sub>标准液:**称取0.4 g的FDPNa<sub>3</sub>标准品溶于适量水中,定容至100 mL,配成4 mg/mL的标准溶液.**DNPH溶液:**0.25 g的DNPH粉末溶于2 mol/L HCl溶液中,定容至250 mL.**Tris-HCl缓冲液:**50 mL的0.1 mol/L Tris碱溶液与42 mL的0.1 mol/L HCl混合定容至100 mL,pH 7.4.**醛缩酶制剂:**把上述纯化得到的醛缩酶用超纯水稀释至2 mg/mL.

##### 1.6.2 建立FDP标准曲线

按表1所列顺序操作建立FDP标准曲线.

表1 重组FBA分解FDP标准溶液

Table 1 The FDP standard by recombinant FBA hydrolysis

组别	空白	1	2	3	4	5	6
FDPNa <sub>3</sub> 标准液(mL)	0	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.35
Tris-HCl溶液(mL)	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7
水(mL)	0.5	0.4	0.35	0.3	0.25	0.2	0.15
醛缩酶制剂(mL)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5

将上述各组按顺序添加各试剂后,混匀,37  $^{\circ}\text{C}$ 水浴15 min,然后每组加入DNPH溶液0.5 mL,冷却至室温,加入0.75N的NaOH溶液3.5 mL混匀,8 min内在540 nm处测定吸光值A.以FDPNa<sub>3</sub>含量(mg)为横坐标,吸光值A为纵坐标,绘制标准曲线,得到回归方程.

#### 1.7 紫外分光光度法及多酶法测定发酵液中FDPNa<sub>3</sub>含量的方法

##### 1.7.1 紫外分光光度法

按照文献[7]中使用的方法,取不同含量的FDPNa<sub>3</sub>标准溶液,加入4 mL浓盐酸,并用水定容至10 mL.沸水浴加热8 min,冷却至室温,在292 nm波长处测定其吸光度.建立标准曲线.取FDP发酵液经稀释后,测定FDP浓度.

##### 1.7.2 多酶法

按照文献[8]所述的方法,取不同含量的FDPNa<sub>3</sub>标准溶液,按顺序依次加入醛缩酶、磷酸甘油脱氢酶、磷酸丙糖异构酶和还原型辅酶I等,连续监测在339 nm波长处吸光值的变化量,建立标准曲线.取FDP发酵液经稀释后,测定FDP浓度.

## 1.8 FDP 发酵液的制备及含量测定

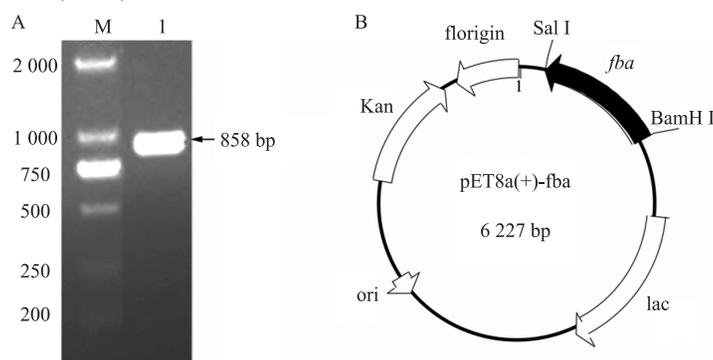
以葡萄糖为主要原料配制液体发酵培养基,本实验室所保存的干酵母为菌种,进行发酵合成 FDP. 所得发酵液经 6 000 r/min 离心 10 min,取上清液,即为微生物发酵法生产 FDP 的溶液.

取 FDP 发酵溶液 2 mL,经 6 000 r/min 离心 10 min 后取上清液,稀释 50 倍. 取 0.5 mL 稀释后样品,按照上述 3 种测定方法分别测定,计算发酵液中 FDPNa<sub>3</sub> 含量. 最后,对 3 种方法进行回收率实验,并对结果分析比较.

## 2 实验结果

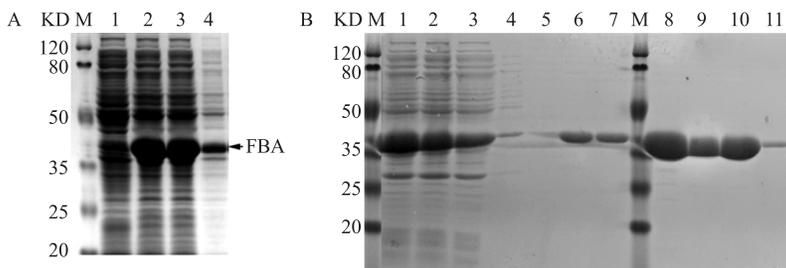
### 2.1 果糖-1,6-二磷酸醛缩酶克隆表达及纯化

从枯草芽孢杆菌中克隆获得醛缩酶基因,PCR 结果显示 *fba* 基因全长为 858 bp,并成功构建重组表达质粒 pET28a(+)-*fba* (图 1),并转化到大肠杆菌 *Rosetta* (DE3) 中,诱导蛋白表达后经 Ni-NTA 柱纯化、透析浓缩获得 FBA 重组蛋白酶(图 2).



A.M: DNA 分子量标准,1:*fba* 目的片段;B.重组质粒 pET28a(+)-*fba* 图谱  
A.M:DNA marker,1:PCR products of *fba*;B.the map of pET28a(+)-*fba* plasmid  
图 1 PCR 产物(A)及重组质粒 pET28a(+)-*fba* 图谱(B)

Fig. 1 PCR products(A) and the map of pET28a(+)-*fba* recombinant plasmid(B)



A.M:蛋白分子量标准;1:空载 *E. coli*/pET28a(+) 全菌蛋白;2:诱导后的 *E. coli*/pET28a(+)-*fba* 全菌蛋白;3:诱导后的 *E. coli*/pET28a(+)-*fba* 上清蛋白;4:诱导后的 *E. coli*/pET28a(+)-*fba* 沉淀蛋白. B.M:蛋白分子量标准;1:全菌总蛋白;2:上清总蛋白;3-7:上清蛋白流出液;8-11:加入洗脱缓冲液流出液

A.M,protein marker;1,total bacterial protein of BL21(DE3) cells with empty pET-28a(+);2,total bacterial protein of BL21(DE3) cells with vector pET-28a(+)-*fba*;3,soluble bacterial protein of BL21(DE3) with vector pET-28a(+)-*fba* after induced expression;4,insoluble bacterial protein of BL21(DE3) with vector pET-28a(+)-*fba* after induced expression. B.M,protein marker;1,total bacterial protein of BL21(DE3) cells with vector pET-28a(+)-*fba* after induced expression;2,soluble bacterial protein of BL21(DE3) with vector pET-28a(+)-*fba* after induced expression;3-7,soluble bacterial protein of effluent from Ni-NTA column;8-11,soluble bacterial protein of eluent from Ni-NTA column

图 2 重组蛋白的表达(A)和纯化(B)

Fig. 2 Expression analysis of recombinant protein(A) and purification(B)

通过 SDS-PAGE 检测,重组 FBA 的分子量约为 35 kDa,将透析浓缩后的 FBA 蛋白酶液,分别分装到 1.5 mL Ep 管中,-20 °C 保存. 经试剂盒测定其蛋白浓度为 4 mg/mL.

### 2.2 重组 FBA 酶学性质研究

#### 2.2.1 重组 FBA 酶活测定

如表 2 所示,对 Ni-NTA 柱纯化后的重组 FBA 酶活进行测定,比活力可达 13.2 U/mg,纯化倍数达到 19 倍,酶活回收率可达 67.5%.

表 2 Ni-NTA 柱纯化重组蛋白  
Table 2 Purification of recombinant His<sub>6</sub>-FBA

纯化步骤	总蛋白/mg	总活力/U	比活力/(U/mg)	回收率/%
粗提	152.4	82.4	0.7	100
Ni-NTA 纯化	3.75	55.7	13.2	67.5

2.2.2 重组 FBA 最适反应 pH

将重组 FBA 在不同 pH 条件下与底物反应后,测定各条件下的活力. 不同 pH 对重组 FBA 酶活力的影响,如图 3 所示,重组 FBA 最适 pH 为 7.5.

2.2.3 重组 FBA 最适反应温度和热稳定性

将纯化后的重组 FBA 在不同的温度条件下与底物反应后,测定各条件下的活力,结果表明重组 FBA 的最佳反应温度为 35 °C (图 4). 通过对重组 FBA 的热稳定性分析发现,当温度达到 50 °C 时酶活下降迅速,而 20 °C 和 30 °C 时酶活相对稳定(图 5).

2.2.4 金属离子对重组 FBA 酶活的影响

金属离子对重组 FBA 酶活力的影响如表 3 所示. 其中 Zn<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup>、Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>、低浓度(1 mmol/L)的 Na<sup>+</sup> 和高浓度(8 mmol/L)的 Fe<sup>2+</sup> 对重组 FBA 均具有抑制作用. 与对照组相比,Zn<sup>2+</sup> 的抑制作用最强,高浓度的 Na<sup>+</sup> 和 K<sup>+</sup> 及低浓度的 Fe<sup>2+</sup> 对重组 FBA 均有一定的激活作用.

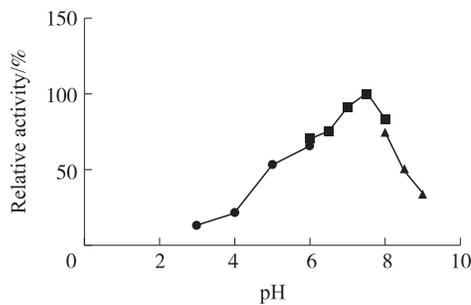


图 3 pH 对重组酶活力影响

Fig. 3 Effect of pH on recombinant FBA activity

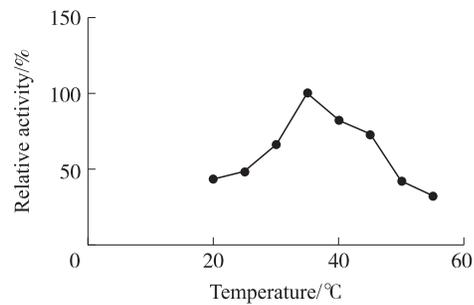


图 4 温度对重组酶活力影响

Fig. 4 Effect of temperature on recombinant FBA activity

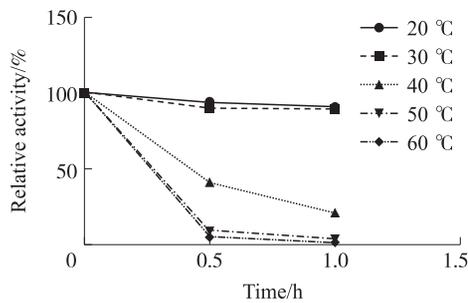


图 5 重组酶的热稳定性

Fig. 5 Thermal stability of recombinant FBA

表 3 金属离子对重组 FBA 活性的影响

Table 3 Effect of metal ions on recombinant FBA

金属离子	FBA 相对酶活力/%	
	1 mmol/L	8 mmol/L
Control	100	100
Zn <sup>2+</sup>	37.7±1.3	24.3±0.4
Ca <sup>2+</sup>	94.2±1.3	82.7±2
Mn <sup>2+</sup>	76.5±3.4	95.5±3.5
Mg <sup>2+</sup>	93.7±2.9	72.7±9
Na <sup>+</sup>	94.7±1.4	115.5±1.2
K <sup>+</sup>	104.3±3.9	109.4±1.2
Fe <sup>2+</sup>	114.7±1.1	61.2±7.3

2.3 单酶法建立 FDP 标准曲线

利用纯化得到的重组 FBA 蛋白测定 FDPNa<sub>3</sub> 标准品,得回归方程  $y = 0.145 4x + 0.175 7, R^2 = 0.991 5$ . 以 FDPNa<sub>3</sub> 含量(mg)为横坐标,吸光值 A 为纵坐标,绘制回归曲线(图 6).

2.4 回收率实验分析

精确称取 1.6 g 的 FDPNa<sub>3</sub> 标准品溶于超纯水中,定容至 1L,按照上述 3 种方法测定 FDPNa<sub>3</sub> 含量,结果如表 4 所示.

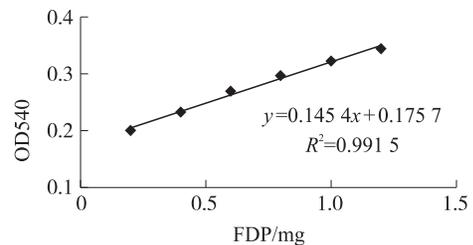


图 6 利用重组 FBA 蛋白酶测定 FDPNa<sub>3</sub> 含量

Fig. 6 Determinated the content of FDPNa<sub>3</sub> with the recombinant FBA enzyme

表 4 FDPNa<sub>3</sub> 回收率测定结果  
Table 4 The result of recovery test of FDPNa<sub>3</sub>

		FDPNa <sub>3</sub> 标准液/mg					$\bar{X}$	RSD/%
		0.8	0.8	0.8	0.8	0.8		
单酶法	测定值/mg	0.793 1	0.792 9	0.799 8	0.799 8	0.796 4	0.796 4	0.427
	回收率/%	99.12	99.11	99.98	99.98	99.55	99.54	
紫外分光光度法	测定值/mg	0.884 1	0.896 9	0.924 1	0.900 4	0.881 4	0.897 38	1.890
	回收率/%	110.51	112.11	115.51	112.55	110.17	112.17	
多酶法	测定值/mg	0.795 2	0.793 6	0.791 1	0.796 7	0.790 3	0.793 4	0.340
	回收率/%	99.40	99.20	98.89	99.56	98.79	99.17	

$\bar{X}$  代表 5 次测量的平均值, RSD 代表相对标准偏差。

## 2.5 酵母发酵液中 FDP 含量检测

分别采用紫外分光光度法、多酶法以及单酶法对发酵法生产 FDP 的发酵溶液中 FDP 的含量进行测定,结果如表 5 所示。

表 5 3 种方法对 FDP 中间产物样品中的 FDP 含量的测定结果  
Table 5 Contents of FDP in the intermediate product determined with three methods

测定次数	1	2	3	4	5	平均值
紫外分光光度法(g/L)	90.267	89.321	90.481	90.059	89.638	89.953 2
多酶法(g/L)	83.932	83.982	84.011	83.977	84.075	83.995 4
单酶法(g/L)	83.753	83.916	83.92	84.005	83.862	83.891 2

为了说明单酶法与紫外分光光度法及多酶法对 FDP 含量检测结果的差异性,利用 SPSS 分析软件对表 5 中数据进行 *T* 检验分析,结果表明单酶法与多酶法测定的数据无显著差异( $P=0.060 2>0.05$ ),而单酶法与化学法测定的数据差异显著( $P=0.006 1<0.05$ )。

## 3 讨论

利用酵母发酵生产 FDP 的过程, FDP 在合成积累过程中受到其他代谢物,如 ATP、ADP、NADH 的影响,其合成速率与分解速率较快,当 FDP 积累到足够量时便很快被分解,因此建立一种快速、准确的测定方法十分必要。

采用多酶法测定发酵液中 FDP 含量时,所需试剂较为昂贵,而且往往要花费较长时间进行反应,才能得出数据。紫外分光光度法测定发酵液中 FDP 含量虽然方法简单、快速,但是其测定结果受到反应液中多种物质的干扰,测定数据不精确。单酶法测定发酵液中 FDP 含量时,基本上不受样品中其他物质的干扰,测定快速、准确、灵敏度高,且不需要大型设备,易于实施和推广。

对于有颜色的酵母发酵反应液,其色泽可能会导致检测数值的偏大。因此当测定样品的颜色较深时,通常可对样品进行适当稀释处理来降低其对测定值的影响。特别是当样品中 FDP 含量较高而且发酵反应液颜色较深时,对反应液进行稀释可以保证检测数据的准确性。

FBA 具有高度的专一性,且该酶催化反应的可逆程度低,样品中葡萄糖、果糖、果糖-6-磷酸和葡萄糖-6-磷酸的含量高低通常不会影响到 FBA 对 FDP 的分解反应。只是发酵液中的 DAP 和 G3P 可能会影响反应中 DNPH 的反应,但是基于反应液中 DAP 和 G3P 的积累量很低且在测定样品时对样品进行稀释,其影响可以忽略不计。

但是当样品中 FDP 含量较低时, DAP 和 G3P 可能使检测的数值偏高。为保证测定数值的准确性,在测定时对样品进行适当稀释后,设定以不加 FBA 重组蛋白酶(用 0.5 mL 水代替)为对照组,进行测定,然后计算实验组与对照组吸光值的差值,以此计算出 FDP 含量,同时也可减少实验误差。

## 4 结语

本研究首次克隆了枯草芽孢杆菌的 *fba* 基因,并构建原核重组表达载体,利用 Ni-NTA 柱对重组 FBA 进行分离纯化和酶学性质研究。建立了 DNPH 作为基质,重组 FBA 作为酶液的单酶法,并对 3 种 FDP 测

定方法进行比较发现,单酶法与公认的多酶法的测定结果不存在显著差异,其结果准确度较高。单酶法测定 FDP 含量具有快速、准确、简便易行,不受样品中其他成分干扰等优点。该方法不仅特别适用于成分复杂的发酵液中 FDP 含量的检测,也可用于常规样品中 FDP 含量测定,具有广泛的应用价值。

#### [参考文献]

- [1] OGAWA H,SHIRAKI H,NAKAGAWA H. Study on the regulatory role of fructose-1,6-diphosphate in the formation of AMP in rat skeletal muscle. A mechanism for synchronization of glycolysis and the purine nucleotide cycle[J]. *Biochem Biophys Res Commun*,1976,68(2):524-528.
- [2] PARK J Y,KIM E J,KWON K J, et al. Neuroprotection by fructose-1,6-bisphosphate involves ROS alterations via p38 MAPK/ERK[J]. *Brain research*,2004,1026(2):295-301.
- [3] GÁMEZ A,ALVA N,ROIG T, et al. Beneficial effects of fructose 1,6-bisphosphate on hypothermia-induced reactive oxygen species injury in rats[J]. *European journal of pharmacology*,2008,590(1/3):115-119.
- [4] VAXILLAIRE M,CAVALCANTI-PROEN A C,DECHAUME A, et al. The common P446L polymorphism in GCKR inversely modulates fasting glucose and triglyceride levels and reduces type 2 diabetes risk in the DESIR prospective general French population[J]. *Diabetes*,2008,57(8):2253-2257.
- [5] LIAN X Y,KHAN F A,STRINGER J L. Fructose-1,6-bisphosphate has anticonvulsant activity in models of acute seizures in adult rats[J]. *Journal of neuroscience*,2007,27(44):12007-12011.
- [6] STEPANENKO B N,BOBROVA L N. Method of production of stable forms of sodium salt of fructose 1,6-diphosphate(sodium-DFP)[J]. *Biokhimiia*,1957,22(6):1019-1022.
- [7] 占达东,李开鸿. 果糖二磷酸钠的紫外吸光度法测定[J]. *琼州学院学报*,2004,11(2):38-39.
- [8] MICHAEL G. D-Fructose 1,6-bisphosphate, dihydroxyacetone phosphate and D-glyceraldehyde 3-phosphate[M]//BEYGM-EYER H U. *Methods of enzymatic analysis*. Germany:Verlag Chemic,1984.
- [9] FUSHINOBU,NISHIMASU S,HATTORI H, et al. Structural basis for the bifunctionality of fructose-1,6-bisphosphate aldolase/phosphatase[J]. *Nature*,2011,478(7370):538-541.
- [10] STOLZENBERGER J,LINDNER S N,WENDISCH V F. The methylotrophic *Bacillus methanolicus* MGA3 possesses two distinct fructose 1,6-bisphosphate aldolases[J]. *Microbiology*,2013,159(Pt 8):1770-1781.
- [11] TONKIN M L,HALAVATY A S,RAMASWAMY R, et al. Structural and functional divergence of the aldolase fold in *Toxoplasma gondii*[J]. *J Mol Biol*,2015,427(4):840-852.
- [12] PROMPIPAK J,SENAWONG T,JOKCHAIYAPHUM K, et al. Characterization and localization of *opisthorchis viverrini* fructose-1,6-bisphosphate aldolase[J]. *Parasitol Int*,2016,S1383-5769(16):30162-30163.
- [13] GIL' MIAROVA F N,BABICHEV A V. Properties of fructose-1,6-diphosphate aldolase from human muscles in atherosclerosis[J]. *Biull Eksp Biol Med*,1982,93(3):35-36.
- [14] DRBELI H,TRZECIAK A,GILLESSEN D, et al. Expression, purification, biochemical characterization and inhibition of recombinant *Plasmodium falciparum* aldolase[J]. *Molecular and biochemical parasitology*,1990,41(1990):259-268.

[责任编辑:黄敏]