

## 果糖激酶（Fructokinase, FK）试剂盒说明书

（微板法 96 样）

### 一、产品简介：

果糖激酶（FK，EC 2.7.1.4）能调节蔗糖与淀粉之间的相互转化，参与调控植物的代谢和生长发育。

果糖激酶（FK）磷酸化果糖生成 6-磷酸果糖，该产物进一步在复合酶的相继作用下，还原 NADP 生成 NADPH，通过检测 NADPH 在 340nm 处光吸收增加速率，得出果糖激酶的酶活性大小。

### 二、试剂盒的组成和配制：

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 120mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	液体 20mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂二	粉剂 mg×1 支	-20℃ 保存	使用前甩几下使试剂落入底部，再加 1.1mL 的蒸馏水溶解备用。
试剂三	液体 μL×1 支	-20℃ 保存	使用前甩几下使试剂落入底部，再加 1.05mL 的蒸馏水溶解备用。
试剂四	粉剂 mg×1 瓶	4℃ 保存	使用前甩几下使试剂落入底部，再加 17mL 的试剂一溶解备用。
试剂五	粉剂 mg×1 支	4℃ 保存	使用前甩几下使试剂落入底部，再加 1.1mL 的蒸馏水溶解备用。

### 三、所需的仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

### 四、果糖激酶（FK）酶活测定：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

#### 1、样本制备：

##### ① 组织样本：

称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液，进行冰浴匀浆。12000rpm，4℃ 离心 10min，取上清，置冰上待测。

**【注】：**若增加样本量，可按照组织质量（g）：提取液体积（mL）为 1：5~10 的比例进行提取。

##### ② 细菌/细胞样本：

先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；取 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液；冰浴超声破碎细菌或细胞（冰浴，功率 20% 或 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；12000rpm，4℃ 离心 10min，取上清，置冰上待测。

**【注】：**若增加样本量，可按照细菌/细胞数量（ $10^4$  个）：提取液（mL）为 1:1000~5000 比例进行提取。

③ 液体样本：直接检测。若浑浊，离心后取上清检测。

#### 2、上机检测：

① 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 340nm。

② 所有试剂解冻至室温（25℃）。

③ 依次在 96 孔板中加入：

试剂名称（μL）	测定管
----------	-----

样本	20
试剂二	10
试剂三	10
试剂四	150
混匀，37℃ 孵育 5min	
试剂五	10
混匀，37℃ 下，立即于 340nm 处读取吸光值 A1，20min 后读取 A2， $\Delta A=A2-A1$ 。	

- 【注】** 1. 若  $\Delta A$  的值在零附近，可以适当延长反应时间到 30min 或更长读取 A2；或适当加大样本量 V1，则试剂四相应减少；改变后的反应时间 T 和加样体积 V1 需代入计算公式重新计算。
2. 若起始值 A1 太大如超过 2（如颜色较深的植物叶片，一般色素较高，则起始值相对会偏高），可以适当减少样本加样量 V1，则改变后的 V1 需代入计算公式重新计算。或向待测样本中加少许活性炭混匀静置 5min 后 12000rpm, 4℃ 离心 10min，上清液用于检测；
3. 若上升趋势不稳定，可以每隔 10S 读取一次吸光值，选取一段线性上升的时间段来参与计算，相对应的 A 值也代入计算公式重新计算。

## 五、结果计算：

### 1、按样本蛋白浓度计算：

酶活定义：每毫克组织蛋白每分钟生成 1nmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$FK (\text{nmol/min/mg prot}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (Cpr \times V1 \div V) \div T = 160.77 \times \Delta A \div Cpr$$

### 2、按样本鲜重计算

酶活定义：每克组织每分钟每分钟生成 1nmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$FK (\text{nmol/min/g 鲜重}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (Cpr \times V1 \div V) \div T = 160.77 \times \Delta A \div W$$

### 3、按细菌/细胞密度计算

酶活定义：每 1 万个细菌/细胞每分钟生成 1nmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$FK (\text{nmol/min}/10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.322 \times \Delta A$$

### 4、按液体体积计算

酶活定义：每毫升液体每分钟生成 1nmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$FK (\text{nmol/min/mL}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div V1 \div T = 160.77 \times \Delta A$$

$\epsilon$ ---NADPH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$ ； d---96 孔板光径，0.5cm；

V---加入提取液体积，1 mL；

V1---加入样本体积，0.02 mL；

V2---反应体系总体积， $2 \times 10^{-4} \text{ L}$ ；

T---反应时间，20min；

500---细菌或细胞总数，500 万。

W---样本质量，g；

Cpr---样本蛋白质浓度，mg/mL；建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。