

果糖激酶（Fructokinase, FK）试剂盒说明书

（货号：ADS-W-T020 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 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 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 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 | 液体 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；冰浴超声波破碎细菌或细胞（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（ μ L） | 测定管 |
|----------------|-----|
| 样本 | 20 |

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

- 【注】1. 若 ΔA 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°C 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。

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

ϵ ---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。