

果糖激酶（Fructokinase, FK）试剂盒说明书

(货号：ADS-F-T020 紫外分光法 48 样 有效期：3 个月)

一、指标介绍：

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：

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 60mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 40mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉剂 1 支	-20℃保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底； 2. 加入 1.7mL 的蒸馏水溶解备用； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂三	液体 1 支	-20℃保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底； 2. 加入 1.7mL 的蒸馏水溶解备用； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂四	粉剂 1 瓶	4℃保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部（可手动甩一甩）； 2. 加入 34mL 的试剂一溶解备用； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂五	液体 1 支	4℃保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底； 2. 加入 1.7mL 的蒸馏水溶解备用； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。

三、实验器材：

研钵（匀浆机）、冰盒（制冰机）、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅（烘箱、培养箱、金属浴）、1ml 石英比色皿、离心管、紫外分光光度计、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

四、指标测定：

建议先选取 1-3 个差异大的样本（例如不同类型或分组）进行预实验，熟悉操作流程，根据预实验结果确定或调整样本浓度，以防造成样本或试剂不必要的浪费！

1、样本提取：

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，可以按照组织质量（g）：提取液体积（mL）为 1：5~10 的比例提取。

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，可按照细菌或细胞数量（10⁴ 个）：提取液体积（mL）为 500~1000：1 的比例进行提取。

③ 液体样本：直接检测。若浑浊，离心后取上清检测。

2、检测步骤:

- ① 紫外分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 340nm，蒸馏水调零。
- ② 所有试剂解冻至室温（25℃）。
- ③ 在 1mL 石英比色皿中依次加入：

试剂组分 (μL)	测定管
样本	70
试剂二	30
试剂三	30
试剂四	580
混匀，37℃ 孵育 5min	
试剂五	30
混匀，立即于 340nm 处读取吸光值 A1， 15min 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，则改变后的反应时间 T 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，则试剂四相应增加，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

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

$$\text{果糖激酶(FK)} (\text{nmol/min/mg prot}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (V1 \times Cpr) \div T = 113.3 \times \Delta A \div Cpr$$

2、按样本鲜重计算

单位定义：每 g 组织每分钟生成 1 nmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{果糖激酶(FK)} (\text{nmol/min/g 鲜重}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T = 113.3 \times \Delta A \div W$$

3、按细菌或细胞密度计算

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

$$\text{果糖激酶(FK)} (\text{nmol/min}/10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.227 \times \Delta A$$

4、按液体体积计算

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

$$\text{果糖激酶(FK)} (\text{nmol/min/mL}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div V1 \div T = 113.3 \times \Delta A$$

ϵ ----NADPH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$ ； d----1mL 石英比色皿，1cm；

V----加入提取液体积，1 mL；

V1----加入样本体积，0.07mL；

V2----反应体系总体积， $7.4 \times 10^{-4} \text{ L}$ ；

T----反应时间，15min；

W----样本质量，g；

500---细菌或细胞总数，500 万；

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。