

果糖激酶（Fructokinase, FK）试剂盒说明书

（货号：ADS-W-T020 微板法 96 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 120mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	液体 20mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	粉剂 1 支	-20°C保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使粉剂落入管底（可手动甩一甩）； 2. 加入 1.1mL 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°C保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底（可手动甩一甩）； 2. 加入 1.05mL 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°C保存	1. 开盖前注意使粉剂落入底部（可手动甩一甩）； 2. 加入 17mL 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°C保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底（可手动甩一甩）； 2. 加入 1.1mL 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）、96 孔板、离心管、酶标仪、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、检测步骤:

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:

试剂组分 (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 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℃ 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。

$$FK (\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times 10^9] \div (C_{pr} \times V_1 \div V) \div T = 160.77 \times \Delta A \div C_{pr}$$

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。

$$FK (\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times 10^9] \div (C_{pr} \times V_1 \div V) \div T = 160.77 \times \Delta A \div W$$

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。

$$FK \text{ (nmol/min / } 10^4 \text{ cell)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times 10^9] \div (500 \times V_1 \div V) \div T = 0.322 \times \Delta A$$

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。

$$FK \text{ (nmol/min/mL)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times 10^9] \div V_1 \div T = 160.77 \times \Delta A$$

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;

V_1 ---加入样本体积, 0.02 mL;

V_2 ---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;

C_{pr} ---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。