

## 果糖激酶 (Fructokinase, FK) 试剂盒说明书

(货号: G0871W 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°C 保存	
试剂一	液体 20mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂二	粉剂 mg×1 支	-20°C 保存	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°C 保存	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°C 保存	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°C 保存	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、水浴锅、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°C 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°C 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 所有试剂可放在 37°C 水浴 5-15min。

③ 试剂二和三和四可按照 10:10:150 比例配成混合液 (一枪加 170μL 该混合液) (该混合液用多少配多少, 现配现用)。

④ 在 96 孔板中依次加入:

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°C下孵育 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, $\Delta A=A2-A1$ 。	

## 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。

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

### 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。

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

### 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。

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

### 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。

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

$\epsilon$ ---NADPH 摩尔消光系数,  $6.22 \times 10^3 \text{ L} / \text{mol} / \text{cm}$ ;       $d$ ---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, 万。

$W$ ---样本质量, g;

$\text{Cpr}$ ---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。