

果糖激酶（Fructokinase, FK）试剂盒说明书

(货号: BP10253F 紫外法 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。