果糖激酶(fructokinase，FRK)试剂盒

微量法 100 管/96 样

注　意：正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义：

蔗糖是大多数高等植物从源到库运输的主要形式, 但进入库器官后被分解为果糖和葡萄糖,果糖在进入下一步代谢前必须由果糖激酶或己糖激酶进行磷酸化，以帮助库组织的建立和库强的提高。果糖激酶是催化果糖磷酸化的主要酶，还可以作为植物的己糖感受器和信号分子，通过影响植物的生长周期来调控植物的代谢和生长发育进程，在库组织中发挥重要的作用。因此，研究果糖激酶对研究植物中果糖代谢调节机制具有十分重要的意义。

测定原理：

FRK 催化果糖合成 6-磷酸果糖，6-磷酸果糖在磷酸己糖异构酶的作用下异构为 6-磷酸葡萄糖，6-磷酸葡萄糖脱氢酶进一步催化 6-磷酸葡萄糖脱氢生成 NADH，NADH 在 340nm 有特征吸收峰。

需自备的仪器和用品：

酶标仪、恒温水浴锅、台式离心机、可调式移液器、96 孔板、研钵、冰和蒸馏水。

试剂的组成和配制：

提取液：100mL×1 瓶，4℃保存；

试剂一：液体 25mL×1 瓶， 4℃保存；

试剂二：粉剂×1 瓶，-20℃保存；临用前加入 12mL 试剂一充分溶解；用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融。

试剂三：粉剂×1 瓶，-20℃保存；临用前加入 3mL 试剂一充分溶解；用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融。

试剂四：液体 30μL×1 瓶，4℃保存；临用前加入 3mL 试剂一充分溶解；用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融。

样本的前处理：

1、细菌或培养细胞：先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；按照细菌或细胞数量（104 个）：提取液体积（mL）为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液），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）； 8000g 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

2、组织：按照组织质量（g）：提取液体积(mL)为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液），进行冰浴匀浆。8000g 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

3、血清（浆）样品：直接检测。

测定步骤：

1、 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 340nm。

2、 配好的试剂于 25℃预热 10min。

3、 样本测定

在 96 孔板中依次加入加入 50μL 样本、100μL 试剂二，25μL 试剂三，25μL 试剂四，混匀，立即记录 340nm 处 30s 时的吸光值 A1 和 5min30s 后的吸光值 A2，计算 ΔA=A2-A1。

注 意：若 ΔA 大于 0.5，需将酶液用提取液稀释，计算公式中乘以相应稀释倍数。或将反应时间缩短至 2min，使 A2-A1 小于 0.5，可提高检测灵敏度。

FRK 活性计算：

1、血清（浆）FRK 活性

单位的定义：每毫升血清（浆）每分钟生成 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

FRK（nmol/min/mL）＝[ΔA×V 反总÷（ε×d）×109]÷V 样÷T=257.2×ΔA

2、组织、细菌或细胞中 FRK 活性

（1）按样本蛋白浓度计算

单位的定义：每 mg 组织蛋白每分钟生成 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。FRK（nmol/min/mg prot）＝[ΔA×V 反总÷（ε×d）×109]÷(V 样×Cpr) ÷T=257.2×ΔA÷Cpr （2）按样本鲜重计算

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

FRK（nmol/min/g 鲜重）＝[ΔA×V 反总÷（ε×d）×109]÷(W× V 样÷V 样总) ÷T=257.2×ΔA÷W （3）按细菌或细胞密度计算

单位的定义：每 1 万个细菌或细胞每分钟生成 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。FRK（nmol/min/104 cell）＝[ΔA×V 反总÷（ε×d）×109]÷(500×V 样÷V 样总)÷T=0.5144×ΔA V 反总：反应体系总体积，2×10-4 L； ε：NADH 摩尔消光系数，6.22×103 L / mol /cm；d：

96 孔板光径，0.5cm；V 样：加入样本体积，0.05mL；V 样总：加入提取液体积，1 mL；T：反应时间，5 min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；500：细菌或细胞总数，500 万。