

## 果糖激酶(fructokinase, FRK)试剂盒说明书

微量法 100 管/96 样

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°C 保存;

试剂一: 液体 25mL×1 瓶, 4°C 保存;

试剂二: 粉剂×1 瓶, -20°C 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°C 保存, 禁止反复冻融。

试剂三: 粉剂×1 瓶, -20°C 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°C 保存, 禁止反复冻融。

试剂四: 液体 30μL×1 瓶, 4°C 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°C 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 ( $10^4$  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°C 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°C 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°C 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  $\Delta A=A2-A1$ 。

**注意:** 若  $\Delta A$  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。

$$\text{FRK (nmol/min/mL)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 257.2 \times \Delta A$$

### 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。

$$\text{FRK (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 257.2 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

#### (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。

$$\text{FRK (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 257.2 \times \Delta A \div W$$

#### (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。

$$\text{FRK (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.5144 \times \Delta A$$

V 反总：反应体系总体积， $2 \times 10^{-4}$  L； $\epsilon$ ：NADH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3$  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。