

Fructokinase Assay Kit

果糖激酶 (FK) 试剂盒说明书

货号:BN72270 | 方法: 微板法 | 规格: 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℃保存	
试剂一	液体 20mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉剂 mg×1 支	-20℃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℃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℃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℃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℃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 (10⁴ 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℃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℃下孵育 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， $\Delta A = A2 - A1$ 。	

注意：本操作流程适用于绝大多数常规样本检测，实验条件可根据实际样本状态适度微调；

针对特殊类型样本，我司技术支持可提供专属优化建议。

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。

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

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。

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

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。

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

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。

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

ϵ ---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；

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。