

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 30 μL×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 50 μL 样本、100 μL 试剂二, 25 μL 试剂三, 25 μL 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 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。

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

- 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。FRK (nmol/min/mg prot) = $[\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 257.2 \times \Delta A \div \text{Cpr}$ (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。

FRK (nmol/min/g 鲜重) = $[\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 257.2 \times \Delta A \div W$

(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。FRK (nmol/min/10⁴ cell) = $[\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.5144 \times \Delta A \times V_{\text{反总}}$
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。