

果糖激酶(fructokinase, FRK)试剂盒说明书

分光法 50 管/48 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，而果糖激酶是催化果糖磷酸化的主要酶。此外，果糖激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，果糖激酶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

分光光度计、恒温水浴锅、台式离心机、可调式移液器、1mL 石英比色皿、研钵、冰和蒸馏水。

试剂的组成和配制

提取液：60mL×1 瓶，4℃保存；

试剂一：液体 50 mL×1 瓶，4℃保存；

试剂二：粉剂×1 瓶，-20℃保存；临用前加入 30mL 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 7mL 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 70μL×1 瓶，4℃保存；临用前加入 7mL 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（ 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℃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、分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 340nm，蒸馏水调零。

2、配好的试剂于 25℃预热 10min。

3、样本测定

在 1mL 石英比色皿中依次加入加入 250μL 样本、500μL 试剂二，125μL 试剂三，125μL 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) 在每分钟生成 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{FRK (nmol/min/mL)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 128.6 \times \Delta A$$

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。

$$\text{FRK (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 128.6 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(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。

$$\text{FRK (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 128.6 \times \Delta A \div W$$

(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。

$$\text{FRK (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.2572 \times \Delta A$$

V 反总: 反应体系总体积, 1×10^{-3} L; ϵ : NADH 摩尔消光系数, 6.22×10^3 L / mol / cm; d:

比色皿光径, 1cm; V 样: 加入样本体积, 0.25mL; 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。