



己糖激酶(HK)试剂盒说明书

(货号:A077-4-1

微板法

96T)

免责声明：测试前请仔细阅读说明书,预试后再进行批量实验,否则由此导致的后果用户自行承担!

一、测定原理：

HK 催化葡萄糖合成 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 NADPH, NADPH 在 340nm 有特征吸收峰。

二、测定意义：

己糖激酶(Hexokinase, HK)(EC 2.7.1.1)广泛存在于动物、植物、微生物和培养细胞中,是葡萄糖分解过程中的第一个关键酶,催化葡萄糖转为 6-磷酸葡萄糖, 6-磷酸葡萄糖是糖酵解和磷酸戊糖途径的交叉点。

三、自备仪器和用品：

酶标仪(340nm)及 96 孔板(附送一块黑色孔板)、恒温水浴锅(或恒温箱)、台式离心机、涡旋混匀器、可调式移液器、研钵、冰、蒸馏水、生理盐水、蛋白测定试剂(组织或细胞样本用,本公司有售)。

四、试剂组成与配制：

(试剂盒有效期 6 个月)

试剂一：液体 15mL×1 瓶, 4℃保存;

试剂二：粉剂×1 瓶, 4℃保存; 临用前加入 5mL 蒸馏水

充分溶解备用, 4℃保存;

试剂三：粉剂×1 支, 4℃保存(如需长时间保存可放-20℃); 临用前 1 支粉剂中加入 0.5mL 蒸馏水, 溶解备用, 用不完的分装后-20℃保存, 避免反复冻融。

五、样本前处理：

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): 生理盐水体积(mL)为 500-1000:1 的比例(建议 500 万细菌或细胞加入 1mL 生理盐水), 超声破碎细菌或细胞(冰浴, 功率 20%或 200W, 超声 3-5S, 间隔 10s, 重复 30 次); 8000g 4℃离心 10min, 取上清置冰上待测(该上清需测其蛋白浓度)。

2、组织：按照组织质量(g): 生理盐水(mL)为 1:5-10 的比例(建议称取 0.1g 组织, 加入 1mL 生理盐水), 进行冰浴匀浆。8000g 4℃离心 10min, 取上清置冰上待测(该上清需测其蛋白浓度)。

3、血清(浆)样品：直接取样检测。

注：本实验不可用磷酸盐缓冲液作为匀浆介质匀浆。

六、测定步骤：

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预实验

1、酶标仪预热 30min 以上, 调节温度至 37℃(如酶标仪不可调温, 可同时准备 37℃水浴锅或恒温箱备用)。

2、使用前将试剂一、二 37℃(哺乳动物)或 25℃(其他物种)预热 10 分钟, 然后再按试剂一: 试剂二溶液: 试剂三溶液为 150:50:2 的比例混合配成工作液, 现配现用。

3、操作表：(在孔板中操作)

试剂名称	空白孔	测定孔
生理盐水(μL)	10	
待测样本(μL)		10
工作液(μL)	190	190
样本和工作液混合的同时开始计时(并轻轻振荡孔板), 在酶标仪 340nm 波长下 20 秒时读取初始吸光度 A1, 将孔板置 37℃孵育, 20 分 20 秒时再次读取吸光度 A2, 计算 $\Delta A=A2-A1$ (此时的反应时间为 20min)。		

注意事项：不同样本中的 HK 活力水平不同, 若 $\Delta A_{测定}>0.4$, 则说明样本活力偏高, 须将样本稀释一定倍数后测定(计算公式中乘以相应稀释倍数), 或缩短反应时间至 10 分钟或 5 分钟, 使 $\Delta A_{测定}<0.4$, 以提高检测灵敏度; 若是 $\Delta A_{测定}<0.01$,

则说明样本 HK 活力偏低, 此时需加大样本量(此时工作液量不变, 计算时变量代入计算公式)或是延长反应时间(如 30 分钟或 40 分钟等)。

七、HK 活性计算：

1、血清(浆)HK 活性：

单位定义：每毫升血清(浆)每分钟催化反应生成 1nmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{HK 活性} \left(\frac{\text{nmol}}{\text{min/mL}} \right) = \frac{\Delta A}{\epsilon \times d} \times 10^9 \times \frac{V_{\text{反应}}}{V_{\text{样}}} \div T$$

2、组织、细菌或细胞中 HK 活性：

(1) 按样本蛋白浓度计算：

单位定义：每 mg 组织蛋白每分钟催化反应生成 1nmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{HK 活性} \left(\frac{\text{nmol}}{\text{min/mg 蛋白}} \right) = \frac{\Delta A}{\epsilon \times d} \times 10^9 \times \frac{V_{\text{反应}}}{V_{\text{样}}} \div T \div \text{Cpr}$$

(2) 按样本鲜重计算：

单位定义：每 g 组织每分钟催化反应生成 1nmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{HK 活性} \left(\frac{\text{nmol}}{\text{min/g 鲜重}} \right) = \frac{\Delta A}{\epsilon \times d} \times 10^9 \times \frac{V_{\text{反应}}}{V_{\text{样}}} \div T \div \frac{W}{V_{\text{样总}}}$$

(3) 按细菌或细胞密度计算：

单位定义：每 1 万个细菌或细胞每分钟催化反应生成 1nmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{HK 活性} \left(\frac{\text{nmol}}{\text{min}/10^4 \text{ 细胞}} \right) = \frac{\Delta A}{\epsilon \times d} \times 10^9 \times \frac{V_{\text{反应}}}{V_{\text{样}}} \div T \div \frac{\text{细胞数}}{V_{\text{样总}}}$$

以上公式中：

$V_{\text{反应}}$ ：反应体系总体积, 0.2×10^{-3} L;

ϵ ：NADPH 摩尔消光系数, 6.22×10^3 L/mol/cm;

d ：比色皿光径, 0.55cm;

10^9 ：mol $\rightarrow$ nmol 单位转换系数;

$V_{\text{样}}$ ：加入样本体积, 0.01mL;

$V_{\text{样总}}$ ：匀浆时加入的提取液总体积, mL;

T ：反应时间, 20min;

Cpr ：样本匀浆蛋白浓度, mg/mL;

W ：样本质量, g;

细胞数：细菌或细胞总数, 10^4 个/mL。