

己糖激酶(hexokinase, HK)试剂盒说明书

(货号: G0810W48 微板法 48 样)

一、产品简介:

己糖激酶(HK, EC 2.7.1.1)广泛存在于动物、植物、微生物和培养细胞中,是糖酵解途径的限速酶之一。

己糖激酶磷酸化葡萄糖并产生 6-磷酸葡萄糖,该产物进一步与 6-磷酸葡萄糖脱氢酶和 NADP 偶联,在 340 nm 测 NADPH 光吸收增加量,进而计算出己糖激酶的活性。

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 60mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 12mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉剂 μg ×1 支	-20℃保存	临用前甩几下或离心使粉剂落入底部,再加 0.65mL 蒸馏水溶解备用。
试剂三	粉剂 mg×1 瓶	4℃保存	临用前甩几下或离心使粉剂落入底部,再加 10mL 试剂一溶解备用。

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、恒温水浴锅、台式离心机、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

四、己糖激酶(HK)活性测定:

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,可以按照组织质量(g):提取液体积(mL)为 1:5~10 的比例提取。

- 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,可按照细菌或细胞数量(10^4 个):提取液体积(mL)为 500~1000:1 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 配置好的试剂二和三可放在 37℃水浴 5-15min。
- ③ 试剂二和三可按照 10:170 比例配成混合液(一枪加 180 μL 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 (μL)	测定管
样本	20
试剂二	10
试剂三	170
混匀, 37℃条件下, 1min 时于 340nm 处读取吸光值 A1, 21min (即 20min 后) 读取 A2, $\Delta A = A2 - A1$ 。	

【注】1.若 ΔA 小于 0.01,可以适当延长反应时间 T (如延长至 31min 或更长读取 A2); 或

适当加大样本量 V1 (如由 20 μ L 增至 50 μ L, 则试剂三相应减少); 或增加取样质量 W。则改变后的 T 和 V1 和 W 需代入计算公式重新计算。

2. 若上升趋势不稳定, 可以每隔 10S 读取一次吸光值, 选取一段线性上升的时间段来参与计算, 相对应的 A 值也代入计算公式重新计算。

五、结果计算:

1、按样本蛋白浓度计算:

单位定义: 每毫克组织蛋白每分钟生成 1 nmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

己糖激酶(HK) (nmol/min/mg prot)=[$\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9$] $\div (V1 \times Cpr) \div T$ =160.77 $\times \Delta A \div Cpr$

2、按样本鲜重计算:

单位定义: 每 g 组织每分钟生成 1 nmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

己糖激酶(HK) (nmol/min/g 鲜重)=[$\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9$] $\div (W \times V1 \div V) \div T$ =160.77 $\times \Delta A \div W$

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生成 1 nmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

己糖激酶(HK) (nmol/min/10⁴ cell)=[$\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9$] $\div (500 \times V1 \div V) \div T$ =0.32 $\times \Delta A$

4、按液体体积计算:

单位定义: 每毫升液体在每分钟生成 1 nmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

己糖激酶(HK) (nmol/min/mL)=[$\Delta A \times V$ 反总 $\div (\epsilon \times d) \times 10^9$] $\div V1 \div T$ =160.77 $\times \Delta A$

ϵ ---NADPH 摩尔消光系数, 6.22 $\times 10^3$ L / mol /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 $\times 10^{-4}$ L;

T---反应时间, 20min;

W---样本质量, g;

500---细菌或细胞总数, 万;

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。