Hexokinase Activity Assay Kit

己糖激酶(HK)试剂盒说明书

货号：G0810F | 方法：紫外分光法 | 规格：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 40mL×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 2.2mL 的蒸馏水溶解备用。
试剂三	粉体 mg×1 瓶	4℃保存	临用前甩几下或离心使粉剂落入底部，再加 36mL 的试剂一溶解备用。

三、所需的仪器和用品：

紫外分光光度计、1mL 石英比色皿（光径 1cm）、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，了解本批样品和实验流程，避免样本和试剂浪费！

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 紫外分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 340nm，蒸馏水调零。

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 40:680 比例配成混合液（一枪加 720μL 该混合液）（**该混合液用多少配多少，现配现用**）。

For research use only. Not for use in diagnostic or therapeutic procedures.
本产品仅供科研使用，不得用于临床诊断或治疗。

④ 在 1mL 石英比色皿（光径 1cm）中依次加入：

试剂（μL）	测定管
样本	80
试剂二	40
试剂三	680
混匀，37℃条件下，1min 时于 340nm 处读取吸光值 A1，21min（即 20min 后）读取 A2，△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：

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)=[ΔA÷(ε×d)×V2×10^9]÷(V1×Cpr)÷T=80.4×ΔA÷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)=[ΔA÷(ε×d)×V2×10^9]÷(W×V1÷V)÷T=80.4×ΔA÷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/10^4 cell)=[ΔA÷(ε×d)×V2×10^9]÷(500×V1÷V)÷T=0.16×ΔA

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)=[ΔA×V 反总÷(ε×d)×10^9]÷V1÷T=80.4×ΔA

ε---NADPH 摩尔消光系数，6.22×10^3 L / mol /cm；　d---1mL 石英比色皿，1cm；
V---加入提取液体积，1 mL；　V1---加入样本体积，0.08mL；
V2---反应体系总体积，8×10^{-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。

For research use only. Not for use in diagnostic or therapeutic procedures.
本产品仅供科研使用，不得用于临床诊断或治疗。