

己糖激酶(hexokinase, HK)试剂盒说明书

(货号: G0810W 微板法 96 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 120mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	液体 20mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	粉剂 μg×1 支	-20°C保存	临用前甩几下或离心使粉剂落入底部,再加 1.1mL 蒸馏水溶解备用。
试剂三	粉剂 mg×1 瓶	4°C保存	临用前甩几下或离心使粉剂落入底部,再加 18mL 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°C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°C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°C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 180μL 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°C条件下,1min 时于 340nm 处读取吸光值 A1,21min(即 20min 后)读取 A2,
 $\Delta A=A2-A1$ 。

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。

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

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。

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

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。

$$\text{己糖激酶(HK) (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.32 \times \Delta A$$

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。

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

ϵ ---NADPH 摩尔消光系数, $6.22 \times 10^3 \text{ L / mol / cm}$; 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, $2 \times 10^{-4} \text{ L}$;

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。