



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)、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、试剂组成和配制: (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℃); 临用前加入 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): 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。

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, 配完即用。

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 10min 或 5min, 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 30min 或 40min 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。

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

以上公式中:

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

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

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。

八、计算举例:

取冻存的鸡胸肉组织 0.1g, 加生理盐水 1mL 进行匀浆, 得到的匀浆上清再用生理盐水稀释 5 倍, 进行测定, 得到 A1 值为 0.185, A2 值为 0.295, 5 倍稀释后的匀浆上清蛋白浓度为 0.882mg/mL, 则计算如下:

$$\begin{aligned} \text{HK 活性} \left(\frac{\text{nmol}}{\text{min/mg 蛋白}} \right) &= \frac{0.295 - 0.185}{6.22 \times 10^3 \times 0.55} \times 10^9 \times \frac{0.2 \times 10^{-3}}{0.01} \\ &\div 20 \div 0.882 \\ &= 34.80 \text{ nmol/min/mg 蛋白} \end{aligned}$$