

己糖激酶(hexokinase, HK)试剂盒说明书

(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℃保存 | |
| 试剂一 | 液体 20mL×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 1.1mL 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 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℃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 的比例进行提取。

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在 25℃ 预热 5min 至室温;

③ 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, 1min 时在 340nm 处读取吸光值 A1, 21min (即 20min 后) 读取 A2, $\Delta A = A2 - A1$ 。 | |

【注】1. 若 ΔA 的值在零附近, 可以适当延长反应时间到 30min 或更长读取 A2, 改变后

的反应时间需代入计算公式重新计算。或适当加大样本量，则改变后的加样体积 V1 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)=[$\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9$] $\div V1 \div T = 160.77 \times \Delta A$

ϵ ---NADPH 摩尔消光系数， 6.22×10^3 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， 2×10^{-4} L；

T---反应时间，20min；

W---样本质量，g；

500---细菌或细胞总数，500 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。