上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话：021-61312973　传真：021-55068248
网址：www.shyuanye.com
邮箱：shyysw@sina.com

己糖激酶(HK)活性检测试剂盒(微量法)

货号： R41825

规格： 100T/96S

保质期：6个月

产品组成及保存条件：

编号	规格	储存条件
提取液ES07	100ml×1瓶	2-8℃保存
试剂-A	20ml×1瓶	2-8℃保存
试剂-B	粉剂×1瓶	2-8℃保存
试剂-C	粉剂×1瓶	-20℃保存

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

简介

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，催化葡萄糖转化为 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。

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。

自备用品：

紫外分光光度计/酶标仪、恒温水浴锅、台式离心机、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔板（UV 板）、研钵、冰和蒸馏水。

样本预处理：

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 个）：提取液 ES07 体积（mL）为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液ES07），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）：提取液 ES07 体积(mL)为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液 ES07），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：直接检测

测定步骤：

1. 分光光度计或酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 340nm，蒸馏水调零。

2. 试剂与配制：

（1）在 试剂-B 中加入 18mL 试剂-A 充分溶解，置于 37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）水浴 5min；现配现用；

（2）在 试剂-C 中加入 1mL 试剂-A，充分溶解待用；用不完的试剂 4℃保存一周；

3. 在微量石英玻璃比色皿或 96 孔板中加入下列试剂：

试剂名称	测定管(ul)
样本	10
试剂-C	10
试剂-B	180
混匀，立即记录340nm处20s时的吸光值A1,比色后迅速将比色皿或酶 标板连同反应液一起放入37℃(哺乳动物)或25℃(其它物种)水浴或恒温箱中，准确反应5分钟；迅速取出比色皿并擦干，340nm 下比色，记录5分20 秒时的吸光度A2, 计算△A=A2-A1。	

计算公式：

a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

1. 血清（浆）HK 活性

单位的定义：每毫升血清（浆）在每分钟生成 1 nmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

HK (nmol/min/mL) = [ΔA×V 反总÷(ε×d)×10^9]÷V 样÷T=643×ΔA

2. 组织、细菌或细胞中 HK 活性

(1) 按样本蛋白浓度计算

单位的定义：每 mg 组织蛋白每分钟生成 1 nmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

HK (nmol/min/mg prot) = [ΔA×V 反总÷(ε×d)×10^9]÷(V 样×Cpr)÷T=643×ΔA÷Cpr

(2) 按样本鲜重计算

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

HK (nmol/min/g 鲜重) = [ΔA×V 反总÷(ε×d)×10^9]÷(W×V 样÷V 样总)÷T=643×ΔA÷W

(3) 按细菌或细胞密度计算

单位的定义：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。

HK (nmol/min/10^4 cell) =[ΔA×V 反总÷(ε×d)×10^9]÷(500×V 样÷V 样总)÷T=1.286×ΔA

注： V 反总：反应体系总体积，2×10^{-4} L；ε：NADPH 摩尔消光系数，6.22×10^3 L / mol /cm；d：比色皿光径，1cm；V 样：加入样本体积，0.01 mL；V 样总：加入提取液体积，1 mL；T：反应时间，5 min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；500：细菌或细胞总数，500万。

b. 用 96 孔板测定的计算公式如下

1. 血清（浆）HK 活性

单位的定义：每毫升血清（浆）在每分钟生成 1 nmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

HK (nmol/min/mL) = [ΔA×V 反总÷(ε×d)×10^9]÷V 样÷T=1286×ΔA

2. 组织、细菌或细胞中 HK 活性

(1) 按样本蛋白浓度计算

单位的定义：每 mg 组织蛋白每分钟生成 1 nmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

HK (nmol/min/mg prot) = [ΔA×V 反总÷(ε×d)×10^9]÷(V 样×Cpr)÷T=1286×ΔA÷Cpr

(2) 按样本鲜重计算

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

HK (nmol/min/g 鲜重) = [ΔA×V 反总÷(ε×d)×10^9]÷(W×V 样÷V 样总)÷T=1286×ΔA÷W

(3) 按细菌或细胞密度计算

单位的定义：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。

HK (nmol/min/10^4 cell) = [ΔA×V 反总÷(ε×d)×10^9]÷(500×V 样÷V 样总)÷T=2.572×ΔA

注： V 反总：反应体系总体积，2×10^{-4} L；ε：NADPH 摩尔消光系数，6.22×10^3 L / mol /cm；d：96 孔板光径，0.5cm；V 样：加入样本体积，0.01 mL；V 样总：加入提取液体积，1 mL；T：反应时间，5 min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；500：细菌或细胞总数，500万

注意事项：

1. 不同匀浆组织中 HK 活力不一样，做正式试验之前请做 1-2 只预试，若 ΔA>0.5，则说明组织活力太高，必须用提取液稀释成适当浓度匀浆上清液（计算公式中乘以相应稀释倍数），或缩短反应时间至 2min,使 ΔA<0.5，以提高检测灵敏度。

2. 最好两个人同时做此实验，一个人比色，一个人计时，以保证实验结果的准确性。