

甘油激酶（GK）活性测定试剂盒说明书

（货号：ADS-F-T024 分光法 48 样）

一、产品简介：

甘油激酶（GK，EC 2.7.1.30）是甘油代谢中的限速酶，催化甘油磷酸化产生 3-磷酸甘油，3-磷酸甘油在 3-磷酸甘油脱氢酶的作用下产生磷酸二羟丙酮，进入糖酵解途径氧化分解释放能量。该酶的缺乏将直接导致细胞不能利用甘油。

本试剂盒采用甘油激酶催化 Mg-ATP 依赖的甘油磷酸化为 3-磷酸甘油，3-磷酸甘油在磷酸甘油氧化酶的作用下产生过氧化氢，过氧化氢与显色剂反应在 510nm 处有最大吸收峰。通过测定 510nm 处的增加速率即可得出甘油激酶的酶活力大小。

二、试剂盒组成和配制：

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 60mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	粉剂 1 支	-20°C保存	用前甩几下或离心使粉剂落入底部，临用前加 1.1mL 蒸馏水溶解备用。用不完的试剂 4°C保存。
试剂二	粉剂 1 支	-20°C保存	用前甩几下或离心使粉剂落入底部，临用前加 2.2mL 蒸馏水溶解备用。用不完的试剂 4°C保存。
试剂三	液体 12mL×1 瓶	4°C保存	
试剂四	液体 20mL×1 瓶	4°C保存	
试剂五	液体 1 支	4°C保存	用前甩几下或离心使试剂落入底部，临用前加 4.4mL 蒸馏水溶解备用。用不完的试剂 4°C保存。
标准品	液体 1 mL×1 支	4°C保存	若重新做标曲，则用到该试剂

三、所需的仪器和用品：

可见分光光度计、1mL 的玻璃比色皿（光径 1cm）、可调试移液器、台式离心机、水浴锅、研钵、冰和蒸馏水。

四、甘油激酶（GK）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：取约 0.1g 组织（水分充足的样本可取 0.5g）到研钵内，加入 1mL 提取液，在冰上进行冰浴匀浆或者液氮研磨。12000rpm，4°C离心 10min，取上清，置冰上待测。

【注】：也可以按照组织质量（g）：提取液体积（mL）为 1：5~10 的比例提取。

② 细菌/真菌样本：先收集细菌/真菌到离心管内，离心后弃上清；取 500 万细菌/真菌加入 1mL 提取

液;冰浴超声波破碎细菌/真菌(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】:也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:澄清的液体样本直接检测,若浑浊则离心后取上清液检测。

2、上机检测:

① 可见分光光度计预热 30min 以上,调节波长至 510nm,蒸馏水调零。

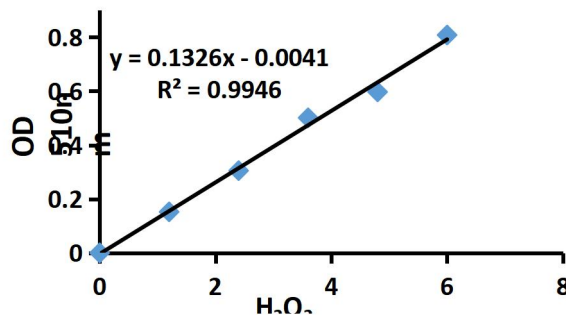
② 在 1mL 的玻璃比色皿(光径 1cm)中依次加入下列试剂:

试剂名称 (μL)	测定管
样本	40
试剂一	20
试剂二	40
试剂三	240
试剂四	380
混匀, 37°C避光静止 5min。	
试剂五	80
混匀, 37°C下, 立即于 510nm 读取吸光值 A1, 室温孵育 5min 后读取 A2。 $\Delta A = A2 - A1$ 。	

【注】:加完试剂五即启动反应,所以试剂五加完需立即混匀检测,若 ΔA 小于 0.01,可增加样本上样量 V_1 ,试剂四相应减少保持原体系不变(如样本上样量为 80 μL 时,试剂四为 340 μL)。或延长反应时间 T(如延长至 10min 或更长),则改变后的 V_1 和 T 需带入计算公式重新计算。

五、结果计算:

1、标准曲线: $y = 0.1326x - 0.0041$: x 为 H_2O_2 标准品浓度($\mu\text{mol}/\text{mL}$), y 为 ΔA 。



2、按样本鲜重计算:

酶活定义: 每克组织每分钟催化生成 $1\mu\text{molH}_2\text{O}_2$ 定义为一个酶活单位 (U)。

$$\text{GK}(\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0041) \div 0.1326 \times V_1] \div (W \times V_1 \div V) \div T = 1.51 \times (\Delta A + 0.0041) \div W$$

3、按样本蛋白浓度计算:

酶活定义: 每毫克组织蛋白每分钟催化生成 $1\mu\text{molH}_2\text{O}_2$ 定义为一个酶活单位 (U)。

$$\text{GK}(\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [(\Delta A + 0.0041) \div 0.1326 \times V_1] \div (V_1 \times \text{Cpr}) \div T = 1.51 \times (\Delta A + 0.0041) \div \text{Cpr}$$

4、按细胞数量计算:

酶活定义: 每 10^4 个细胞每分钟催化生成 $1\mu\text{molH}_2\text{O}_2$ 定义为一个酶活单位 (U)。

$$\text{GK}(\mu\text{mol}/\text{min}/10^4\text{cell}) = [(\Delta A + 0.0041) \div 0.1326 \times V_1] \div (500 \times V_1 \div V) \div T = 0.003 \times (\Delta A + 0.0041)$$

5、按液体体积计算:

酶活定义: 每毫升液体每分钟催化生成 $1\mu\text{molH}_2\text{O}_2$ 定义为一个酶活单位 (U)。

$$GK(\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL})=[(\Delta A+0.0041)\div 0.1326\times V1]\div V1\div T=1.51\times(\Delta A+0.0041)$$

V---加入提取液体积, 1 mL;

V1---加入样本体积, 0.04mL;

T---反应时间, 5 min;

W---样本质量; 500---细胞数量;

Cpr---样本蛋白质浓度, mg/mL; 建议使用本公司的蛋白含量测定试剂盒。

附: 标准曲线制作过程:

1. 用蒸馏水把母液 (250mM) 稀释成以下浓度梯度的标准品: 0,2,4,6,8,10mM。也可根据实际情况来调整标准品浓度。
2. 按照测定管 (样本替换为标准品) 加样体系操作, 依据结果即可制作标准曲线。