

甘油激酶（GK）活性测定试剂盒说明书

（货号：ADS-W-T024 微板法 96 样 有效期：3 个月）

一、指标介绍：

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：

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 100mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉剂 1 支	-20℃保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底（可手动甩一甩）； 2. 加入 1.1mL 蒸馏水溶解备用； 3. 用不完的试剂 4℃保存。
试剂二	粉剂 1 支	-20℃保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底（可手动甩一甩）； 2. 加入 1.1mL 蒸馏水溶解备用； 2. 用不完的试剂 4℃保存。
试剂三	液体 6mL×1 瓶	4℃避光保存	
试剂四	液体 9mL×1 瓶	4℃保存	
试剂五	液体 1 瓶	4℃避光保存	1. 开盖前注意使液体落入底部（可手动甩一甩）； 2. 加入 2.2mL 蒸馏水溶解备用； 3. 用不完的试剂 4℃保存。
标准品	液体 1 mL×1 支	4℃避光保存	1. 若重新做标曲，则用到该试剂； 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制； 3. 溶解后的标品一周内用完。

三、实验器材：

研钵（匀浆机）、冰盒（制冰机）、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅（烘箱、培养箱、金属浴）、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

四、指标测定：

建议先选取 1-3 个差异大的样本（例如不同类型或分组）进行预实验，熟悉操作流程，根据预实验结果确定或调整样本浓度，以防造成样本或试剂不必要的浪费！

1、样本提取：

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℃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℃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、检测步骤:

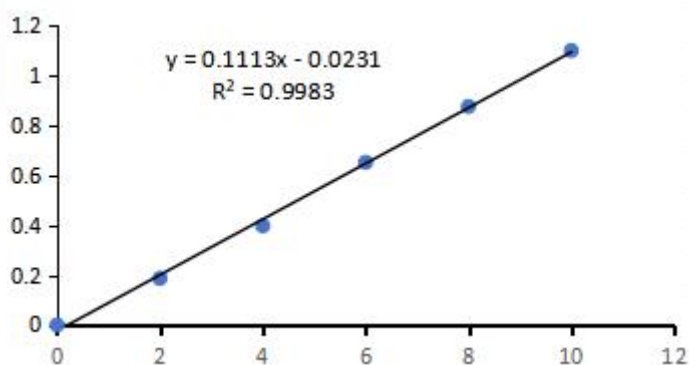
- ① 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 510nm。
② 在 96 孔板中依次加入下列试剂:

试剂组分 (μL)	测定管
样本	10
试剂一	10
试剂二	10
试剂三	60
试剂四	90
混匀, 37℃避光静置 5min。	
试剂五	20
混匀, 37℃下, 立即于 510nm 读取吸光值 A1, 避光孵育 5min 后读取 A2。ΔA=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 V1, 试剂四相应减少保持原体系不变 (如样本上样量为 20μL 时, 试剂四为 80μL); 或延长反应时间 T (如延长至 10min 或更长), 则改变后的 V1 和 T 需带入计算公式重新计算。

五、结果计算:

- 1、标准曲线: $y = 0.1113x - 0.0231$: x 为 H_2O_2 标准品浓度(μmol/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 1μmol H_2O_2 定义为一个酶活单位 (U)。

$$GK(\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0231) \div 0.1113 \times V1] \div (W \times V1 \div V) \div T = 1.8 \times (\Delta A + 0.0231) \div W$$

- 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 1μmol H_2O_2 定义为一个酶活单位 (U)。

$$GK(\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [(\Delta A + 0.0231) \div 0.1113 \times V1] \div (V1 \times Cpr) \div T = 1.8 \times (\Delta A + 0.0231) \div Cpr$$

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)。

$$\text{GK}(\mu\text{mol}/\text{min}/10^4\text{cell})=[(\Delta A+0.0231)\div 0.1113\times V_1]\div (500\times V_1\div V)\div T=0.004\times (\Delta A+0.0231)$$

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)。

$$\text{GK}(\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL})=[(\Delta A+0.0231)\div 0.1113\times V_1]\div V_1\div T=1.8\times (\Delta A+0.0231)$$

V---加入提取液体积，1 mL；

V1---加入样本体积，0.01mL；

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 标曲为非必做实验，用户可根据实验需求制作标曲，亦可直接采用说明书计算公式进行结果计算。
- 2 标准品母液浓度为 250mM。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0，2，4，6，8，10 mM。也可根据实际样本调整标准品浓度。
- 3 标品稀释参照表如下：

吸取标准品母液 40uL，加入 960uL 蒸馏水，混匀得到 10 mM 的标品稀释液待用。						
标品浓度 mM	0	2	4	6	8	10
标品稀释液 uL	0	40	80	120	160	200
水 uL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

- 4 依据测定管加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。

试剂组分 (μL)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	10	
蒸馏水		10
试剂一	10	10
试剂二	10	10
试剂三	60	60
试剂四	90	90
混匀，37℃避光静止 5min。		
试剂五	20	20
混匀，37℃下，立即于 510nm 读取各管吸光值， $\Delta A=A$ 测定-0 浓度管。		