

己糖激酶(hexokinase, HK)试剂盒说明书

(货号: ADS-F-T001 紫外分光法 48 样 有效期: 3 个月)

一、指标介绍:

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:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 60mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 40mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉剂 1 瓶	-20℃保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部(可手动甩一甩); 2. 加入 2.2mL 的蒸馏水溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂三	粉体 1 瓶	4℃保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部(可手动甩一甩); 2. 加入 36mL 的试剂一溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。

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)、1ml 石英比色皿、离心管、紫外分光光度计、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:

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、检测步骤:

① 紫外分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 340nm, 蒸馏水调零。

② 配置好的试剂二和三在 25℃预热 5min 至室温;

③ 在 1mL 石英比色皿中依次加入:

试剂 (μL)	测定管
样本	80

试剂二	40
试剂三	680
混匀，1min 时于 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。

$$\text{己糖激酶(HK)} (\text{nmol/min/mg prot}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (V1 \times Cpr) \div T = 80.4 \times \Delta A \div Cpr$$

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。

$$\text{己糖激酶(HK)} (\text{nmol/min/g 鲜重}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T = 80.4 \times \Delta A \div W$$

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。

$$\text{己糖激酶(HK)} (\text{nmol/min}/10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.16 \times \Delta A$$

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。

$$\text{己糖激酶(HK)} (\text{nmol/min/mL}) = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V1 \div T = 80.4 \times \Delta A$$

ϵ ---NADPH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$ ； d ---1mL 石英比色皿，1cm；
V---加入提取液体积，1 mL； $V1$ ---加入样本体积，0.08mL；
 $V2$ ---反应体系总体积， $8 \times 10^{-4} \text{ L}$ ； 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。