

己糖激酶(HK)活性检测试剂盒说明书

Hexokinase Assay Kit

紫外分光光度法

货号: AK113

规格: 50T/48S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
提取液 ES07	60ml×1 瓶	4℃ 保存
AK113-A	30ml×1 瓶	4℃ 保存
AK113-B	粉剂×1 瓶	4℃ 保存
AK113-C	5ml×1 瓶	4℃ 保存
AK113-D	粉剂× 1 支	-20℃ 保存
AK113-E	粉剂× 1 支	-20℃ 保存
AK113-F	粉剂× 1 支	-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、恒温水浴锅、台式离心机、可调式移液器、1 mL 石英比色皿、研钵、冰和蒸馏水。

试剂预配制:

AK113-B: 临用前加入 30mL 蒸馏水充分溶解备用; 用不完的试剂 4℃ 保存一周;

AK113-D: 临用前加入 4mL 蒸馏水充分溶解备用; 用不完的试剂 4℃ 保存一周;

AK113-E: 临用前加入 2mL 蒸馏水充分溶解备用; 现配现用;

AK113-F: 临用前加入 250ul AK113-A 和 250ul 蒸馏水充分溶解备用; 用不完的试剂 4℃ 保存一周;

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。

检测步骤:

1. 分光光度计预热 30min, 调节波长到 340 nm, 蒸馏水调零。
2. AK113-A、B、C、D、E 分别置于 25℃ (一般物种) 或者 37℃ (哺乳动物) 水浴中预热 10min。
3. 按下表加入下列试剂:

试剂名称	测定管 (ul)
------	----------

AK113-A	400
AK113-B	400
AK113-C	80
AK113-D	80
AK113-E	40
AK113-F	8
样本	30

混匀，加样本的同时开始计时，在 340 nm 波长下记录 20 秒时的初始吸光度 A1，比色后迅速将比色皿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 $\Delta A=A_2-A_1$ 。

计算公式：

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。

$$HK (U/mL) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 1113 \times \Delta A$$

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。

$$HK (U/mg \text{ prot}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times Cpr) \div T = 1113 \times \Delta A \div Cpr$$

(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。

$$HK (U/g \text{ 鲜重}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1113 \times \Delta A \div W$$

(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。

$$HK (U/10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 2.226 \times \Delta A$$

注： V 反总：反应体系总体积， 1.038×10^{-3} 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，0.03 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. 如果一次性测定样本数较多，可将试剂 A、B、C、D、E、F 按比例配成混合液，预热 10min。
2. 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 $\Delta A > 0.5$ ，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 $\Delta A < 0.5$ ，以提高检测灵敏度。
3. 比色皿中反应液的温度必须保持 37℃或 25℃，取小烧杯一只装入一定量的 37℃或 25℃蒸馏水，将此烧杯放入 37℃或 25℃水浴锅中，在反应过程中把比色皿连同反应液放在此烧杯中；且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。