

己糖激酶(hexokinase, HK)试剂盒说明书

(货号: G0810F 紫外分光法 48 样)

一、产品简介:

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:

| 试剂名称 | 规格 | 保存要求 | 备注 |
|------|-------------|---------|-------------------------------------|
| 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 μg×1 支 | -20℃ 保存 | 临用前甩几下或离心使粉剂落入底部,再加 2.2mL 的蒸馏水溶解备用。 |
| 试剂三 | 粉体 mg×1 瓶 | 4℃ 保存 | 临用前甩几下或离心使粉剂落入底部,再加 36mL 的试剂一溶解备用。 |

三、所需的仪器和用品:

紫外分光光度计、1mL 石英比色皿(光径 1cm)、恒温水浴锅、台式离心机、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

四、己糖激酶(HK)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:

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、上机检测:

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 时在 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 A_2 , 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 V_1 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。

己糖激酶(HK) (nmol/min/mg prot)=[$\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times 10^9$] $\div (V_1 \times C_{pr}) \div T = 80.4 \times \Delta A \div C_{pr}$

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。

己糖激酶(HK) (nmol/min/g 鲜重)=[$\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times 10^9$] $\div (W \times V_1 \div V) \div T = 80.4 \times \Delta A \div W$

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。

己糖激酶(HK) (nmol/min/ 10^4 cell)=[$\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times 10^9$] $\div (500 \times V_1 \div V) \div T = 0.16 \times \Delta A$

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。

己糖激酶(HK) (nmol/min/mL)=[$\Delta A \times V_{反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9$] $\div V_1 \div T = 80.4 \times \Delta A$

ϵ ---NADPH 摩尔消光系数, 6.22×10^3 L / mol / cm; d---1mL 石英比色皿, 1cm;

V---加入提取液体积, 1 mL;

V_1 ---加入样本体积, 0.08mL;

V_2 ---反应体系总体积, 8×10^{-4} L;

T---反应时间, 20min;

W---样本质量, g;

500---细菌或细胞总数, 500 万;

C_{pr} ---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。