

## 己糖激酶(hexokinase, HK)试剂盒说明书

(货号: G0810W 微板法 96 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 120mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	液体 20mL×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 1.1mL 蒸馏水溶解备用。
试剂三	粉剂 mg×1 瓶	4℃ 保存	临用前甩几下或离心使粉剂落入底部,再加 18mL 试剂一溶解备用。

## 三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、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 酶标仪预热 30min 以上,调节波长至 340nm。

② 配置好的试剂二和三在 25℃ 预热 5min 至室温;

③ 在 96 孔板中依次加入:

试剂 (μL)	测定管
样本	20
试剂二	10
试剂三	170
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  $\Delta A$  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。

己糖激酶(HK) (nmol/min/mg prot)=[ $\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9$ ] $\div (V1 \times Cpr) \div T = 160.77 \times \Delta A \div Cpr$

### 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。

己糖激酶(HK) (nmol/min/g 鲜重)=[ $\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9$ ] $\div (W \times V1 \div V) \div T = 160.77 \times \Delta A \div W$

### 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<sup>4</sup> cell)=[ $\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9$ ] $\div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.32 \times \Delta A$

### 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)=[ $\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9$ ] $\div V1 \div T = 160.77 \times \Delta A$

$\epsilon$ ---NADPH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3$  L / mol /cm； d---96 孔板光径，0.5cm；

V---加入提取液体积，1 mL；

V1---加入样本体积，0.02 mL；

V2---反应体系总体积， $2 \times 10^{-4}$  L；

T---反应时间，20min；

W---样本质量，g；

500---细菌或细胞总数，500 万；

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。