

己糖激酶(hexokinase, HK)试剂盒说明书

微量法 100管/96样

正式测定前务必取2-3个预期差异较大的样本做预测定

测定意义：

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。

测定原理：

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。

自备实验用品及仪器：

紫外分光光度计/酶标仪、恒温水浴锅、台式离心机、可调式移液器、微量石英比色皿/96孔板、研钵、冰和蒸馏水。

试剂的组成和配制

提取液：100mL×1瓶，4℃保存；

试剂一：液体20mL×1瓶，4℃保存；

试剂二：粉剂×1瓶，4℃保存；

试剂三：粉剂×1支，-20℃保存；

样本的前处理

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），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），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。

测定步骤

1、分光光度计或酶标仪预热30min以上，调节波长至340nm，蒸馏水调零。

2、样本测定

（1）在试剂二中加入18mL试剂一充分溶解，置于37℃（哺乳动物）或25℃（其它物种）水浴5min；用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融。

（2）在试剂三中加入1mL试剂一，充分溶解待用；用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融。

（3）在微量石英比色皿或96孔板中加入10μL样本、10μL试剂三和180μL试剂二，混匀，立即记录340nm处20s时的吸光值A1和5min20s后的吸光值A2，计算 $\Delta A = A_2 - A_1$ 。

注意：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。

己糖激酶(hexokinase, HK)试剂盒说明书活性计算

a.用微量石英比色皿测定的计算公式如下

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。

$$\text{HK (nmol/min/mL)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 643 \times \Delta A$$

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。

$$\text{HK (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 643 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(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。

$$\text{HK (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 643 \times \Delta A \div W$$

(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。

$$\text{HK (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1.286 \times \Delta A$$

V反总：反应体系总体积， 2×10^{-4} 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，0.01 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。

b.用96孔板测定的计算公式如下

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。

$$\text{HK (nmol/min/mL)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 1286 \times \Delta A$$

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。

$$\text{HK (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 1286 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(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。

$$\text{HK (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1286 \times \Delta A \div W$$

(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。

$$\text{HK (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 2.572 \times \Delta A$$

V反总：反应体系总体积， 2×10^{-4} L； ϵ ：NADPH摩尔消光系数， 6.22×10^3 L/mol/cm；d：96孔板光径，0.5cm；V样：加入样本体积，0.01

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。

www.pyram.cn