



# 己糖激酶(HK)试剂盒说明书

(A077-3-1 分光光度法 50管/48样)

**免责声明:** 测试前请仔细阅读说明书,预试后再进行批量实验,否则由此导致的后果用户自行承担!

## 一、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。

## 二、测定意义:

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。

## 三、自备仪器和用品:

紫外分光光度计及 1mL 容量(1cm 光径)石英比色皿、恒温水浴锅、台式离心机、涡旋混匀器、可调式移液器、研钵、冰、蒸馏水、生理盐水, 蛋白测定试剂(组织或细胞样本用,本公司有售)。

## 四、试剂组成和配制: (试剂盒有效期 6 个月)

**试剂一:** 液体 40mL×1 瓶, 4℃ 保存;

**试剂二:** 粉剂×1 瓶, 4℃ 保存; 临用前加入 15mL 蒸馏水充分溶解备用, 4℃ 保存;

**试剂三:** 粉剂×1 支, 4℃ 保存(如需长时间保存可放-20℃); 临用前往 1 支粉剂中加入 1mL 蒸馏水, 溶解备用, 用不完的分装后-20℃ 保存, 避免反复冻融。

## 五、样本前处理:

**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 ( $10^4$ ): 生理盐水体积 (mL) 为 500-1000:1 的比例(建议 500 万细菌或细胞加入 1mL 生理盐水), 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): 生理盐水 (mL) 为 1:5-10 的比例(建议称取 0.1g 组织, 加入 1mL 生理盐水), 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:** 直接取样检测。

**注:** 本实验不可用磷酸盐缓冲液作为匀浆介质匀浆。

## 六、测定步骤:

**正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预实验**

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

**2、** 使用前将试剂一、二于 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其他物种) 预热 10 分钟。

**3、** 操作表:

试剂名称 (μL)	测定管
试剂一	750
试剂二	250
试剂三	20
待测样本	40

将上述试剂按顺序加入 1mL 石英比色皿中, 立即混匀, 加样本的同时开始计时, 在 340nm 波长下记录 20 秒时的初始吸光度 A1 和 20 分 20 秒时的吸光度 A2, 计算  $\Delta A=A_2-A_1$  (此时的反应时间为 20min)。

### 注意事项:

1、如果一次性测定样本数较多, 可将试剂一、二、三按照比例配成混合液(现配现用)。

2、不同样本中的 HK 活力不同, 若  $\Delta A>0.5$ , 则说明样本 HK 活力偏高, 须将样本稀释一定倍数后测定(计算公式中乘以相应稀释倍数), 或缩短反应时间至

10min 或 5min, 使  $\Delta A<0.5$ , 以提高检测灵敏度; 若是  $\Delta A<0.01$ , 则说明样本 HK 活力偏低, 此时需加大样本量(此时其它试剂量不变, 计算时变量代入计算公式)或是延长反应时间(如 30min 或 40min 等)。

## 七、HK 活性计算:

### 1、血清(浆) HK 活性:

**单位定义:** 每毫升血清(浆)每分钟催化反应生成 1nmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{HK 活性 (nmol/min/mL)} = \frac{\Delta A}{\varepsilon \times d} \times 10^9 \times \frac{V_{\text{反总}}}{V_{\text{样}}} \div T$$

### 2、组织、细菌或细胞中 HK 活性:

#### (1) 按样本蛋白浓度计算:

**单位定义:** 每 mg 组织蛋白每分钟催化反应生成 1nmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{HK 活性 (nmol/min/mg 蛋白)} = \frac{\Delta A}{\varepsilon \times d} \times 10^9 \times \frac{V_{\text{反总}}}{V_{\text{样}}} \div T \div \text{Cpr}$$

#### (2) 按样本鲜重计算:

**单位定义:** 每 g 组织每分钟催化反应生成 1nmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

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

#### (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催化反应生成 1nmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{HK 活性 (nmol/min/10}^4 \text{ 细胞)} = \frac{\Delta A}{\varepsilon \times d} \times 10^9 \times \frac{V_{\text{反总}}}{V_{\text{样}}} \div T \div \text{细胞数}$$

### 以上公式中:

$V_{\text{反总}}$ : 反应体系总体积,  $1.06 \times 10^{-3}$  L;

$\varepsilon$ : NADPH 摩尔消光系数,  $6.22 \times 10^3$  L/mol/cm;

$d$ : 比色皿光径, 1cm;

$10^9$ : mol $\rightarrow$ nmol 单位转换系数;

$V_{\text{样}}$ : 加入样本体积, 0.04mL;

$V_{\text{样总}}$ : 匀浆时加入的提取液总体积, mL;

$T$ : 反应时间, 20min;

$\text{Cpr}$ : 样本蛋白浓度, mg/mL;

$W$ : 样本质量, g;

细胞数: 细菌或细胞总数,  $10^4$  个。

## 八、计算举例:

取冻存的鸡胸肉组织 0.1g, 加生理盐水 1mL 进行匀浆, 得到的匀浆上清再用生理盐水稀释 5 倍, 进行测定, 得到 A1 值为 0.122, A2 值为 0.262, 5 倍稀释后的匀浆上清蛋白浓度为 0.882mg/mL, 则计算如下:

$$\begin{aligned} \text{HK 活性 (nmol/min/mg 蛋白)} &= \frac{0.262 - 0.122}{6.22 \times 10^3 \times 1} \times 10^9 \times \frac{1.06 \times 10^{-3}}{0.04} \\ &\div 20 \div 0.882 \\ &= 33.81 \text{ nmol/min/mg 蛋白} \end{aligned}$$