

上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0395

Size: 100T/96S

己糖激酶(HK)检测试剂盒说明书

微量法

*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

一、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。

二、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。

三、需自备的仪器和用品：

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 (ZC-1036: UV板)、研钵、冰和蒸馏水。

四、试剂的组成和配置：

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
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	

五、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。

六、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4℃保存一周；

（2）在试剂三中加入1mL 试剂一，充分溶解待用；用不完的试剂4℃保存一周；

（3）在微量石英比色皿或96 孔板（UV板）中加入10 μ L 样本、10 μ L 试剂三和180 μ L 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 $\Delta A = A2 - A1$ 。

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。

七、HK 活性计算

● 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。

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

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。

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

(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。

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

(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。

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

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，0.01mL；V样总：加入提取液体积，1mL；T：反应时间，5min；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。

● 用96 孔板 (UV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。

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

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。

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

(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。

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

(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。

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

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, 0.01mL; V 样总: 加入提取液体积, 1mL; 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。