

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-S0671

Size: 50T/48S

## 己糖激酶 (HK) 检测试剂盒说明书

### 可见分光光度法

\*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:

可见分光光度计、恒温水浴锅、台式离心机、可调式移液器、1 mL 石英比色皿、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	60mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	液体 30mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	粉剂× 1 瓶	4°C保存	临用前加入 30mL 蒸馏水充分溶解备用;用不完的试剂 4°C保存一周
试剂三	液体 5 mL×1 瓶	4°C保存	
试剂四	粉剂×1 支	-20°C保存	用时每支加 4mL 双蒸水充分溶解备用,用不完

			的试剂 4°C保存一周
试剂五	粉剂×1支	-20°C保存	用时每支加 2mL 双蒸水充分溶解备用，用不完的试剂 4°C保存一周
试剂六	粉剂×1支	-20°C保存	用时每支加 250 μL 试剂一和 250 μL 蒸馏水充分溶解备用，用不完的试剂 4°C保存一周；

### 五、操作步骤：

#### ● 样品测定的准备：

1、细菌或培养细胞：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°C 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°C 离心 10min，取上清，置冰上待测。

3、血清 (浆) 样品：直接检测。

#### ● 测定操作：

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

2. 将试剂一、二、三、四和五置于 37°C (哺乳动物) 或 25°C (其他物种) 预热 10min。

3. 加样表

试剂名称 (μL)	测定管
试剂一	400
试剂二	400
试剂三	80
试剂四	80

试剂五	40
试剂六	8
样本	30

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5 分20秒时的吸光度A2，计算  $\Delta A = A_2 - A_1$ 。

## 六、注意事项：

如果一次性测定样本数较多，可将试剂一、二、三、四、五、六按比例配成混合液，预热10min。

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：

### ● 血清（浆）HK活力的计算：

单位的定义：每毫升血清（浆）在每分钟生成1nmol NADPH定义为一个酶活力单位。

$$\text{HK (U/mL)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 1113 \times \Delta A$$

### ● 组织、细菌或细胞中HK活力计算：

#### (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1nmol NADPH定义为一个酶活力单位。

$$\text{HK (U/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 1113 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

#### (2) 按样本鲜重计算

单位的定义：每g组织每分钟生成1nmol NADPH定义为一个酶活力单位。

$$\text{HK (U/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1113 \times \Delta A \div W$$

### (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1nmol NADPH定义为一个酶活力单位。

$$HK (U/104 cell) = [\Delta A \times V_{反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{样} \div V_{样总}) \div T = 2.226 \times \Delta A$$

$V_{反总}$ ：反应体系总体积， $1.038 \times 10^{-3}$  L； $\epsilon$ ：NADPH摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3$  L / mol / cm； $d$ ：比色皿光径，1cm； $V_{样}$ ：加入样本体积，0.03 mL； $V_{样总}$ ：加入提取液体积，1 mL； $T$ ：反应时间，5 min； $C_{pr}$ ：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。