

上海茁彩生物科技有限公司

Shanghai zcibio technology Co., Ltd.



生化检测原理示意图



货号: ZC-S0395 规格: 100管/96样

己糖激酶(hexokinase, HK)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

产品内容:

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°C保存	-

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。

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。

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(UV板)、研钵、冰和蒸馏水。

操作步骤:

一 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(10⁴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。

二 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°C(哺乳动物)或25°C(其它物种)水浴5min; 用不完的试剂4°C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 Δ 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 Δ 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 Δ A<0.5,以提高检测灵敏度。

HK 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。

- 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。

HK(U/mg prot)=[ΔA×V 反总÷(ε×d)×10°]÷(V 样×Cpr)÷T=643×ΔA÷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。

HK(U/g 鲜重)=[ΔA×V 反总÷(ε×d)×10 $^\circ$]÷(W ×V 样÷V 样总)÷T=643×ΔA÷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。

HK (U/10⁴ cell) = [ΔA×V 反总÷ (ε×d)×10⁹]÷(500×V 样÷V 样总)÷T=1.286×ΔA V 反总:反应体系总体积,2×10⁻⁴ L;ε: NADPH摩尔消光系数,6.22×10³ 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。

b. 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。

HK(U/mL)=[ΔΑ×V 反总÷(ε×d)×10°]÷V 样÷T=1286×ΔΑ

- 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。

HK (U/mg prot) = [ΔA×V 反总÷(ε×d)×10°]÷(V 样×Cpr)÷T=1286×ΔA÷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。

HK(U/g 鲜重)=[ΔA×V 反总÷(ε×d)×10 $^{\circ}$]÷(W× V 样÷V 样总)÷T=1286×ΔA÷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。

HK (U/10⁴ cell) = [ΔA×V 反总÷ (ε×d) ×10°]÷(500×V 样÷V 样总)÷T=2.572×ΔA

V 反总: 反应体系总体积, 2×10⁻⁴ L; ε: NADPH摩尔消光系数, 6.22×10³ 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。

Shanghai ZCIBIO Technology Co.,Ltd. TEL:021-65681082 Email:zcibio@163.com www.zcibio.com