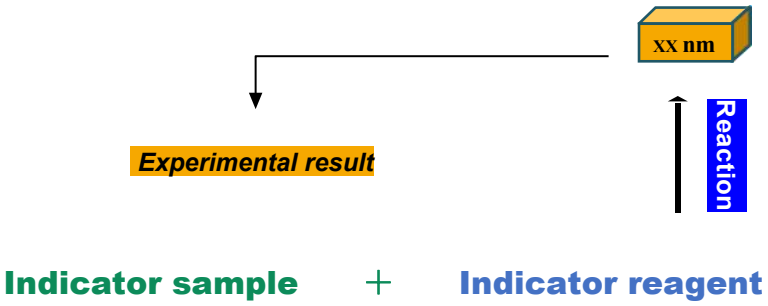
上海茁彩生物科技有限公司

Shanghai zcibio technology Co.,Ltd.



生化检测原理示意图

货号：ZC-S0671　　规格：50管/48样

己糖激酶（ hexokinase ，HK)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

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	60mL×1瓶	4℃保存	-
试剂一	液体30mL×1瓶	4℃保存	-
试剂二	粉剂× 1 瓶	4℃保存	临用前加入30mL蒸馏水充分溶解备用；用不完的试剂4℃保存一周
试剂三	液体5 mL×1瓶	4℃保存	-
试剂四	粉剂×1支	-20℃保存	用时每支加4mL双蒸水充分溶解备用，用不完的试剂4℃保存一周
试剂五	粉剂×1支	-20℃保存	用时每支加2mL双蒸水充分溶解备用，用不完的试剂4℃保存一周
试剂六	粉剂×1支	-20℃保存	用时每支加250μL试剂一和250μL蒸馏水充分溶解备用，用不完的试剂4℃保存一周；

产品说明：

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。

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。

试验中所需的仪器和试剂：

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。

操作步骤：

一、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℃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、测定操作：

分光光度计预热30min以上，调节波长至340nm，蒸馏水调零。

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

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ΔA= A2- A1。

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ΔA> 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ΔA< 0.5，以提高检测灵敏度。

HK活性计算：

一、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。

HK（U/mL）＝[ΔA×V反总÷（ε×d）×10^9]÷V样÷T=1113×ΔA

二、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。

HK（U/mg prot）＝[ΔA×V反总÷（ε×d）×10^9]÷(V样×Cpr) ÷T=1113×ΔA÷Cpr

（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。

HK（U/g 鲜重）＝[ΔA×V反总÷（ε×d）×10^9]÷(W ×V样÷V样总)÷T=1113×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1nmol NADPH定义为一个酶活力单位。

HK（U/104 cell）＝[ΔA×V反总÷（ε×d）×10^9]÷(500×V样÷V样总)÷T=2.226×ΔA

V反总：反应体系总体积，1.038×10^{-3} 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，0.03 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。