

己糖激酶 (HK) 活性检测试剂盒 (分光光度计法)  
(本试剂盒仅供科研使用)

### 产品包装

产品编号	产品名称	产品规格
YFX0189	己糖激酶 (HK) 活性检测试剂盒	50 管/48 样

### 产品内容

名称	规格	储存条件
提取液	液体 60mL × 1 瓶	4℃
试剂一	液体 30mL × 1 瓶	4℃
试剂二	粉剂 × 1 瓶: 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。	4℃
试剂三	液体 5mL × 1 瓶	4℃
试剂四	粉剂 × 1 支: 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。	-20℃
试剂五	粉剂 × 1 支: 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。	-20℃
试剂六	粉剂 × 1 支: 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。	-20℃

## 一、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。

## 二、自备材料

紫外分光光度计、恒温水浴锅、台式离心机、可调式移液器、1mL 石英比色皿、研钵、冰和蒸馏水。

## 三、样品准备

1、组织: 按照质量 (g): 提取液体积(mL)为 1: 5~10 的比例(建议称取约 0.1g, 加入 1mL 提取液)加入提取液, 进行冰浴匀浆; 8000g 4℃ 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

2、细胞: 收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清, 按照细胞数量( $10^4$  个): 提取液体积(mL) 为 500~1000: 1 的比例(建议 500 万细胞加入 1mL 提取液), 冰浴超声波破碎细胞 (功率 300w, 超声 3 秒, 间隔 10 秒, 重复 30 次); 8000g 4℃ 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

3、血清/血浆: 直接测定。

#### 四、操作步骤

正式测定前, 必需取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

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

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, 比色后迅速将比色皿连同反应液一起放入 37°C (哺乳动物) 或 25°C (其它物种) 水浴或恒温箱中, 准确反应 5 分钟; 迅速取出比色皿并擦干, 340 nm 下比色, 记录5分20秒时的吸光度 A2, 计算  $\Delta A = A2 - A1$ 。

#### 五、HK 活性的计算

- 1、按照样本蛋白浓度计算:

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。

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

- 2、按照样本鲜重计算:

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。

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

- 3、按照细胞数量计算:

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。

$$HK (U/10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 2.226 \times \Delta A。$$

- 4、按照血清/血浆体积计算:

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。

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

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; 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。

#### 六、注意事项

- 1、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。
- 2、比色皿中反应液的温度必须保持 37°C 或 25°C, 取小烧杯一只装入一定量的 37°C 或 25°C

蒸馏水, 将此烧杯放入 37°C 或 25°C 水浴锅中。在反应过程中把比色皿连同反应液放在此烧杯中。

- 3、最好两个人同时做此实验, 一个人比色, 一个人计时, 以保证实验结果的准确性。
- 4、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。