

己糖激酶 (HK) 活性检测试剂盒 (微量法)
(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 |
|---------|-------------------------|------------|
| YFX0190 | 己糖激酶 (HK) 活性检测试剂盒 (微量法) | 100 管/96 样 |

产品内容

| 名称 | 规格 | 储存条件 |
|-----|----------------|------|
| 提取液 | 液体 100mL × 1 瓶 | 4℃ |
| 试剂一 | 液体 20mL × 1 瓶 | 4℃ |
| 试剂二 | 粉剂 × 1 瓶 | 4℃ |
| 试剂三 | 粉剂 × 1 支 | -20℃ |

一、产品说明

己糖激酶 (HK) (EC2.7.1.1) 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。

二、自备材料

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、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, 冰浴匀浆后于 4℃, 8000g 离心 10min, 取上清置于冰上待测。

2、细胞/细菌: 先收集细胞/细菌到离心管内, 离心后弃上清, 按照细胞/细菌数量 (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); 然后 4℃, 8000g 离心 10min, 取上清置于冰上待测。

3、血清或血浆: 直接检测。

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、酶标仪或分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 340nm, 蒸馏水调零。

2、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。

3、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。

4、在微量石英比色皿或 96 孔板中加入 10μL 样本、10μL 试剂三和 180μL 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 $\Delta A = A2 - A1$ 。

五、HK 活性计算公式

A. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

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 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

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

2、按照样本鲜重计算

单位的定义：每 g 组织每分钟生成 1nmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

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

3、按照细胞/细菌数量计算

单位的定义：每 1 万个细菌或细胞每分钟生成 1nmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

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

4、按照液体体积计算

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

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

V 反应：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。

B. 用 96 孔板测定的计算公式如下

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 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

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

2、按照样本鲜重计算

单位的定义：每 g 组织每分钟生成 1nmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

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

5、按照细胞/细菌数量计算

单位的定义：每 1 万个细菌或细胞每分钟生成 1nmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

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

6、按照液体体积计算

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

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

V 反应：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，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。

六、注意事项

1、若 $\Delta A > 0.5$ ，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。