

己糖激酶(hexokinase, HK)试剂盒说明书

(紫外分光法 48 样)

一、产品简介：

己糖激酶（HK，EC 2.7.1.1）广泛存在于动物、植物、微生物和培养细胞中，是糖酵解途径的限速酶之一。

己糖激酶磷酸化葡萄糖并产生 6-磷酸葡萄糖，该产物进一步与 6-磷酸葡萄糖脱氢酶和 NADP 偶联，在 340 nm 测 NADPH 光吸收增加量，进而计算出己糖激酶的活性。

二、试剂盒的组成和配制：

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 100mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	液体 40mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂二	粉剂 μg×1 支	-20℃ 保存	临用前甩几下或离心使粉剂落入底部，再加 2.2mL 的蒸馏水溶解备用。
试剂三	粉体 mg×1 瓶	4℃ 保存	临用前甩几下或离心使粉剂落入底部，再加 36mL 的试剂一溶解备用。

三、所需的仪器和用品：

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

四、己糖激酶(HK)活性测定：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

1、样本制备：

① 组织样本：

称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液，进行冰浴匀浆。12000rpm，4℃ 离心 10min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可以按照组织质量（g）：提取液体积(mL)为 1：5~10 的比例提取。

② 细菌/细胞样本：

先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；取 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液；冰浴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）；12000rpm，4℃ 离心 10min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照细菌或细胞数量（ 10^4 个）：提取液体积（mL）为 500~1000：1 的比例进行提取。

③ 液体样本：直接检测。若浑浊，离心后取上清检测。

2、上机检测：

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

② 配置好的试剂二和三在 25℃ 预热 5min 至室温；

③ 在 1mL 石英比色皿中依次加入：

试剂（μL）	测定管
样本	80
试剂二	40
试剂三	680
混匀，1min 时于 340nm 处读取吸光值 A ₁ ，21min（即 20min 后）读取 A ₂ ， $\Delta A=A_2-A_1$ 。	

【注】1.若 ΔA 的值在零附近,可以适当延长反应时间到30min或更长读取 A_2 ,改变后的反应时间需代入计算公式重新计算。或适当加大样本量,则改变后的加样体积 V_1 需代入计算公式重新计算。

2.若上升趋势不稳定,可以每隔10S读取一次吸光值,选取一段线性上升的时间段来参与计算,相对应的A值也代入计算公式重新计算。

五、结果计算:

1、按样本蛋白浓度计算

单位定义:每毫克组织蛋白每分钟生成1nmol的NADPH定义为一个酶活力单位。

己糖激酶(HK) (nmol/min/mg prot) = $[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times 10^9] \div (V_1 \times Cpr) \div T = 80.4 \times \Delta A \div Cpr$

2、按样本鲜重计算

单位定义:每g组织每分钟生成1nmol的NADPH定义为一个酶活力单位。

己糖激酶(HK) (nmol/min/g 鲜重) = $[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times 10^9] \div (W \times V_1 \div V) \div T = 80.4 \times \Delta A \div W$

3、按细菌或细胞密度计算

单位定义: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。

己糖激酶(HK) (nmol/min/ 10^4 cell) = $[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times 10^9] \div (500 \times V_1 \div V) \div T = 0.16 \times \Delta A$

4、按液体体积计算

单位定义:每毫升液体每分钟生成1nmol的NADPH定义为一个酶活力单位。

己糖激酶(HK) (nmol/min/mL) = $[\Delta A \times V_2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_1 \div T = 80.4 \times \Delta A$

ϵ ---NADPH 摩尔消光系数, 6.22×10^3 L / mol / cm; d---1mL 石英比色皿, 1cm;

V---加入提取液体积, 1 mL;

V_1 ---加入样本体积, 0.08mL;

V_2 ---反应体系总体积, 8×10^{-4} L;

T---反应时间, 20min;

W---样本质量, g;

500---细菌或细胞总数, 500 万;

Cpr---样本蛋白质浓度, mg/mL; 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。