

己糖激酶(HK)活性检测试剂盒说明书

Hexokinase Assay Kit

微量法

货号: AK114

规格: 100T/96S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
提取液 ES07	100ml×1 瓶	4℃保存
AK114-A	20ml×1 瓶	4℃保存
AK114-B	粉剂×1 瓶	4℃保存
AK114-C	粉剂×1 瓶	-20℃保存

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介:

意义: 己糖激酶 (Hexokinase, 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。

原理: 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。

自备用品:

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。

样本预处理:

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 (10^4 个): 提取液 ES07 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 ES07), 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 ES07 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 ES07), 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。

检测步骤:

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. 试剂与配制:
 - (1) 在 AK114-B 中加入 18mL AK114-A 充分溶解, 置于 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其它物种) 水浴 5min; 现配现用;
 - (2) 在 AK114-C 中加入 1mL AK114-A, 充分溶解待用; 用不完的试剂 4℃保存一周;
3. 在微量石英玻璃比色皿或 96 孔板中加入下列试剂:

试剂名称	测定管 (ul)
样本	10
AK114-C	10
AK114-B	180
混匀, 立即记录 340nm 处 20s 时的吸光值 A1, 比色后迅速将比色皿或酶标板连同反应液一起放入 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (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,340nm下比色,记录5分20秒时的吸光度A₂,计算 $\Delta A = A_2 - A_1$ 。

计算公式:

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。

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

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。

$$HK (nmol/min/mg \text{ prot}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 643 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

(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。

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

(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。

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

注: $V_{\text{反总}}$: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; $V_{\text{样}}$:加入样本体积, 0.01 mL; $V_{\text{样总}}$:加入提取液体积, 1 mL; T :反应时间, 5 min; C_{pr} :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. 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。

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

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。

$$HK (nmol/min/mg \text{ prot}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 1286 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

(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。

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

(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。

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

注: $V_{\text{反总}}$: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; $V_{\text{样}}$:加入样本体积, 0.01 mL; $V_{\text{样总}}$:加入提取液体积, 1 mL; T :反应时间, 5 min; C_{pr} :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。

注意事项:

- 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。
- 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。