

己糖激酶(HK)活性检测试剂盒（紫外分光光度法）

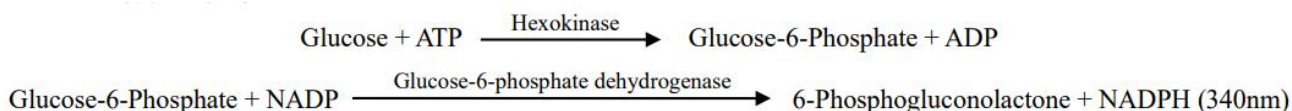
产品货号：BA2147

产品规格：50T/48S

产品简介：

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。

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。



产品组成：

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体60mL×1瓶	2-8℃
试剂一	液体30mL×1瓶	2-8℃
试剂二	粉剂×1瓶	2-8℃
试剂三	液体5mL×1瓶	2-8℃
试剂四	粉剂×1瓶	-20℃
试剂五	粉剂×1瓶	-20℃
试剂六	粉剂×2支	-20℃

溶液的配制：

1. 试剂二：临用前加入30mL蒸馏水充分溶解备用，用不完的试剂4℃保存4周；
 2. 试剂四：临用前加入5mL蒸馏水充分溶解备用，用不完的试剂-20℃分装保存4周；
 3. 试剂五：临用前加入3mL蒸馏水充分溶解备用，用不完的试剂-20℃分装保存4周；
 4. 试剂六：临用前取1支试剂六加入125 μL试剂一和125 μL蒸馏水充分溶解备用，用不完的试剂4℃保存2周。
- （该试剂为冻干试剂，可能存在肉眼观察试剂量相差较大甚至量很少的现象，此现象不影响使用，实际质量相同）。

需自备的仪器和用品：

紫外分光光度计、水浴锅/恒温培养箱、台式离心机、可调式移液器、1mL石英比色皿、研钵/匀浆器/细胞超声破碎仪、冰和蒸馏水。

操作步骤：

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

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（10⁴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）等液体样本：直接检测。若有沉淀请离心后取上清待测。

二、测定步骤



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司
 Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q：807961520

邮箱：saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

1. 分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 340nm，蒸馏水调零。
2. 将试剂一、二、三、四和五置于 37°C 预热 10min。
3. 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，立即充分混匀后于 340nm 处测定 20s 时的吸光值 A1，迅速置于 37°C 准确反应 5min，拿出迅速擦干测定 5min 20s 时的吸光值 A2，记录 340nm 下 20s 时吸光值 A1 和 5min 后的吸光值 A2。计算 $\Delta A = A2 - A1$ 。

注：如果一次性测定样本数较多，可将试剂一、二、三、四、五按比例配成混合液，预热 10min 后使用。

三、HK 活性计算

1. 血清（浆）HK 活性的计算：

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。

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

2. 组织、细菌或细胞中 HK 活性计算：

- (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。

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

- (2) 按样本质量计算：

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。

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

- (3) 按细菌或细胞数量计算：

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。

$$\text{HK 活性 (U/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (N \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1113 \times \Delta A \div N$$

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，0.03mL；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；N：细菌或细胞总数，以万计。

注意事项：

1. 比色皿中反应液的温度必须保持 37°C，取小烧杯一只装入一定量的 37°C 蒸馏水，将此烧杯放入 37°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。
2. 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。
3. 不同匀浆组织中 HK 活力不一样，做正式试验之前请做 1-2 次预试验，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，或缩短反应时间至 2min，使 $\Delta A < 0.5$ ，以提高检测灵敏度。注意同步修改计算公式。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司
 Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱：saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com