

Hexokinase Activity Assay Kit

己糖激酶(HK)试剂盒说明书

货号:BN72300 | 方法: 紫外分光法 | 规格: 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 60mL×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, 了解本批样品和实验流程, 避免样本和试剂浪费!

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 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可放在 37℃水浴 5-15min。

③ 试剂二和三可按照 40:680 比例配成混合液 (一枪加 720μL 该混合液) (该混合液用多少配多少, 现配现用)。

④ 在 1mL 石英比色皿（光径 1cm）中依次加入：

试剂（μL）	测定管
样本	80
试剂二	40
试剂三	680
混匀，37℃条件下，1min 时于 340nm 处读取吸光值 A1，21min（即 20min 后）读取 A2， $\Delta A = A2 - A1$ 。	

注意：本操作流程适用于绝大多数常规样本检测，实验条件可根据实际样本状态适度微调；

针对特殊类型样本，我司技术支持可提供专属优化建议。

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 1 nmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

己糖激酶(HK) (nmol/min/mg prot) = $[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (V1 \times Cpr) \div T = 80.4 \times \Delta A \div Cpr$

2、按样本鲜重计算：

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

己糖激酶(HK) (nmol/min/g 鲜重) = $[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T = 80.4 \times \Delta A \div W$

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 1 nmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

己糖激酶(HK) (nmol/min/10⁴ cell) = $[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.16 \times \Delta A$

4、按液体体积计算：

单位定义：每毫升液体在每分钟生成 1 nmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

己糖激酶(HK) (nmol/min/mL) = $[\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V1 \div T = 80.4 \times \Delta A$

ϵ ---NADPH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3 \text{ L} / \text{mol} / \text{cm}$ ；
 V ---加入提取液体积，1 mL；
 $V2$ ---反应体系总体积， $8 \times 10^{-4} \text{ L}$ ；
 W ---样本质量，g；
 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。

d ---1mL 石英比色皿，1cm；
 $V1$ ---加入样本体积，0.08mL；
 T ---反应时间，20min；
 500 ---细菌或细胞总数，万；