

己糖激酶(hexokinase, HK)试剂盒说明书

微量法 100管/96样

正式测定前务必取2-3个预期差异较大的样本做预测定

测定意义

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。

测定原理

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。

需自备的仪器和用品

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、研钵、冰和蒸馏水。

试剂的组成和配制

提取液: 100mL×1瓶, 4°C保存;

试剂一: 液体20mL×1瓶, 4°C保存;

试剂二: 粉剂×1瓶, 4°C保存;

试剂三: 粉剂×1支, -20°C保存;

样本的前处理

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(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20%或200W, 超声3s, 间隔10s, 重复30次); 8000g 4°C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°C离心10min, 取上清, 置冰上待测。

3、血清(浆)样品: 直接检测。

测定步骤

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. 样本测定

(1) 在试剂二中加入18mL试剂一充分溶解, 置于37°C(哺乳动物)或25°C(其它物种)水浴5min; 用不完的试剂分装后-20°C保存, 禁止反复冻融。

(2) 在试剂三中加入1mL试剂一, 充分溶解待用; 用不完的试剂分装后-20°C保存, 禁止反复冻融。

(3) 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 $\Delta A = A_2 - A_1$ 。

注意: 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。

HK活性计算

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。

$$\text{HK (nmol/min/mL)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div V_{\text{样}} \div T = 643 \times \Delta A$$

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。

$$\text{HK (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 643 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

(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。

$$\text{HK (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 643 \times \Delta A \div W$$

(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。

$$\text{HK (nmol/min/104 cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1.286 \times \Delta A$$

V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样：加入样本体积，0.01 mL；V样总：加入提取液体积，1 mL；T：反应时间，5 min；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、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。

$$\text{HK (nmol/min/mL)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div V_{\text{样}} \div T = 1286 \times \Delta A$$

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。

$$\text{HK (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 1286 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

(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。

$$\text{HK (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1286 \times \Delta A \div W$$

(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。

$$\text{HK (nmol/min/104 cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 2.572 \times \Delta A$$

V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样：加入样本体积，0.01 mL；V样总：加入提取液体积，1 mL；T：反应时间，5 min；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。