

## 己糖激酶（HK）活性检测试剂盒（可见分光光度法）

产品货号：BA1443

产品规格：50管/48样

### 产品简介：

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。

**注意：实验之前建议选择2-3个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。**

### 产品组成：

产品名称	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支	-20℃
试剂五	粉剂×1瓶	-20℃
试剂六	粉剂×2支	-20℃

### 溶液的配制：

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℃保存一周；

试剂四：用时每支加入4mL双蒸水充分溶解备用，用不完的试剂4℃保存一周；

试剂五：用时每支加入2mL双蒸水充分溶解备用，用不完的试剂4℃保存一周；

试剂六：用时取1支加入125μL试剂一和125μL蒸馏水充分溶解备用，用不完的试剂4℃保存一周。

### 自备材料：

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

### 操作步骤（仅供参考）：

#### 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）

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℃离心10min，取上清，置冰上待测。

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。

血清（浆）样本：直接检测。

#### 二、测定步骤

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℃（哺乳动物）或25℃（其他物种）预热10min。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q：807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com

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，立即混匀，加样本的同时开始计时，在340nm波长下记录20秒时的初始吸光度A1，比色后迅速将比色皿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 $\Delta A = A_2 - A_1$ 。

### 三、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1nmol的NADPH定义为一个酶活力单位。

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

2. 组织、细菌或细胞中HK活性

(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的NADPH定义为一个酶活力单位。

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

(2) 按样本质量计算

单位的定义：每g组织每分钟生成1nmol的NADPH定义为一个酶活力单位。

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

(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的NADPH定义为一个酶活力单位。

$$HK (U/10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 2.226 \times \Delta A$$

V反总：反应体系总体积， $1.038 \times 10^{-3}$  L； $\epsilon$ ：NADPH摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3$  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；500：细菌或细胞总数，500万。

#### 注意事项:

- 如果一次性测定样本数较多，可将试剂一、二、三、四、五、六按比例配成混合液，预热10min。
- 比色皿中反应液的温度必须保持37℃或25℃，取小烧杯一只装入一定量的37℃或25℃蒸馏水，将此烧杯放入37℃或25℃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。
- 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。
- 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（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。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

QQ: 807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com