

己糖激酶(hexokinase, HK)试剂盒说明书

分光光度法 50 管/48 样

注 意：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、恒温水浴锅、台式离心机、可调式移液器、1 mL 石英比色皿、研钵、冰和蒸馏水。

试剂的组成和配制：

提取液：60mL×1 瓶，4℃保存；

试剂一：液体 30mL×1 瓶，4℃保存；

试剂二：粉剂×1 瓶，4℃保存；临用前加入 30mL 蒸馏水充分溶解备用；用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融。

试剂三：液体 5 mL×1 瓶，4℃保存；

试剂四：粉剂×1 支，-20℃保存，临用前加入 4mL 蒸馏水充分溶解备用；用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融。

试剂五：粉剂×1 支，-20℃保存；临用前加入 2mL 蒸馏水充分溶解备用；用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融。

试剂六：粉剂×1 支，-20℃保存；临用前加入 250 μL 试剂一和 250 μL 蒸馏水充分溶解备用；用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融。

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（ 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。

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）样品：直接检测。

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 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其它物种) 预热 10 分钟。

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 1 mL 石英比色皿中, 立即混匀, 加样本的同时开始计时, 在 340 nm 波长下记录 20 秒时的初始吸光度 A1 和 5 分 20 秒时的吸光度 A2, 计算 $\Delta A = A2 - A1$ 。

注意事项:

1、为了减小操作误差, 建议将试剂一、二、三、四、五按比例配成混合液, 预热 10min, 取 30μL 样本+8μL 试剂六+1mL 混合液, 混匀后按照上述步骤检测。

2、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:

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。

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

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 1 nmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

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

(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。

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

(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。

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

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, 0.03 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。