组织及血液己糖激酶（HK）活性检测试剂盒说明书

产品货号	产品名称	包装规格	测定方法
AMHC1-C48	组织及血液己糖激酶（HK）试剂盒	48T	常量法

产品说明：

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。

试剂组成：

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

溶液的配制：

1、试剂二：临用前加入30 mL 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）

操作步骤：

一、样本处理

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（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

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℃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℃准确反应 5min，拿出迅速擦干测定 5min20s 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ΔA=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。 HK活性（U/mL）=[ΔA×V反总÷（ε×d）×10^9]÷V样÷T=1113×ΔA

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。

HK活性（U/mg prot）=[ΔA×V反总÷（ε×d）×10^9]÷(V样×Cpr) ÷T=1113×ΔA÷Cpr

（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。

HK活性（U/g 质量）=[ΔA×V反总÷（ε×d）×10^9]÷(W ×V样÷V样总)÷T=1113×ΔA÷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。

HK活性（U/10^4 cell）=[ΔA×V 反总÷（ε×d）×10^9]÷(N×V样÷V样总) ÷T=1113×ΔA÷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℃，取小烧杯一只装入一定量的37℃蒸馏水，将此烧杯放入37℃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 ΔA>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ΔA<0.5，以提高检测灵敏度。注意同步 修改计算公式。