

## 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-M96	组织及血液己糖激酶（HK）试剂盒	96T	微量法

### 产品说明：

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 110 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 25 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二A	液体 3mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二B	粉剂×1瓶	2-8℃保存
试剂二C	粉剂×1瓶	-20℃保存
试剂二D	粉剂×1瓶	-20℃保存
试剂三	粉剂×2 支	-20℃保存

### 溶液的配制：

1. 试剂二B：临用前加入 12mL 试剂一溶解，用不完的试剂2-8℃分装保存4 周；
2. 试剂二C：临用前加入4mL 试剂一溶解，用不完的试剂-20℃分装保存4 周，避免反复冻融；
3. 试剂二D：临用前加入4mL 试剂一溶解，用不完的试剂-20℃分装保存4 周，避免反复冻融；
4. **试剂二的配制：**根据样本量按试剂二A：试剂二B：试剂二C：试剂二D=100μL：500μL：150μL：150μL（5T）的比例配制试剂二，现用现配；
5. 试剂三：临用前取 1 支，加入 0.5 mL 试剂一，充分溶解；用不完的试剂-20℃保存2 周，避免反复冻融。（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、紫外分光光度计或酶标仪预热30min以上，调节波长至340nm，紫外分光光度计蒸馏水调零。
- 2、试剂二临用前于37℃预热10min。
- 3、加样表：

试剂名称	测定管
试剂二 (μL)	180
试剂三 (μL)	10
样本 (μL)	10

将上述试剂按顺序加入微量石英比色皿或96孔UV板中，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（酶标仪有控温功能可将温度调至37℃），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 $\Delta A=A2-A1$ 。

## 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活性（U/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1nmol的NADPH定义为一个酶活力单位。

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

##### （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活性（U/104 cell）= $[\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (N \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 643 \times \Delta A \div N$

V反总：反应体系总体积， $2 \times 10^{-4}$  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，0.01mL；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。

## B、用96孔UV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1nmol的NADPH定义为一个酶活力单位。HK活性(U/mL)=[ $\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109$ ]  $\div V_{\text{样}} \div T = 1071.7 \times \Delta A$

### 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活性(U/mg prot)=[ $\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109$ ]  $\div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 1071.7 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$

#### (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活性(U/g 质量)=[ $\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109$ ]  $\div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}})$

$\div T = 1071.7 \times \Delta A \div W$  (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活性(U/10<sup>4</sup> cell)=[ $\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109$ ]  $\div (N \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1071.7 \times \Delta A \div N$

V反总: 反应体系总体积, 2×10<sup>-4</sup> L;  $\epsilon$ : NADPH摩尔消光系数, 6.22×10<sup>3</sup> L/mol/cm; d: 96孔板光径, 0.6cm; V样: 加入样本体积, 0.01mL; 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  $\Delta A > 0.5$ , 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, 或缩短反应时间至2min, 使  $\Delta A < 0.5$ , 以提高检测灵敏度。注意同步修改计算公式。