

己糖激酶（HK）检测试剂盒（微量法）

货号：PMK1120

保存：-20℃保存 12 个月

规格：48T/48S 96T/96S

适用样本：血清（浆）、动植物组织/细胞、细胞上清、细菌

产品简介

己糖激酶（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。本试剂盒可检测各种生物样本中己糖激酶（HK）活性，其原理是 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，生成的 NADPH 将 WST-8 还原生成橙黄色的 formazan（甲臜），在 450nm 左右检测有最大吸收峰。通过检测 450nm 处光吸收增加速率来计算该酶活性。

产品内容

| 试剂盒组分 | 规格 | | 储存条件 |
|-----------|--------|--------|-----------|
| | 48T | 96T | |
| 提取液 | 50mL | 100mL | 4℃ 保存 |
| 试剂一 | 12mL | 24mL | 4℃ 保存 |
| 试剂二 | 粉剂×1 瓶 | 粉剂×2 瓶 | 4℃ 避光保存 |
| 试剂三 | 60μL | 120μL | -20℃ 避光保存 |
| 试剂四 | 0.75mL | 1.5mL | 4℃ 避光保存 |
| NADPH 标准品 | 粉剂×1 支 | 粉剂×1 支 | -20℃ 避光保存 |

自备耗材

酶标仪或分光光度计（能测 450nm 处的吸光度）及恒温培养箱
96 孔板或微量玻璃比色皿、移液枪及枪头
去离子水
匀浆器（如果是组织样本）

试剂准备

注意：各组分（小管试剂）开盖前，请先低速离心。

提取液：即用型；使用前，平衡到室温；4℃ 保存。

试剂一：即用型；使用前，平衡到室温；4℃ 保存。

试剂二：临用前配制，每瓶加入 11mL 试剂一充分溶解。未用完的已溶解的试剂二可 4℃ 保存一周。若需长期保存，请分装后-20℃ 保存，避免反复冻融。

试剂三：即用型；整个实验过程中，冰上避光放置；-20℃ 避光保存。

试剂四：即用型；整个实验过程中，冰上避光放置；4℃ 避光保存。

工作液的配制：每孔配制 190μL 工作液：吸取 179μL 试剂二，1μL 试剂三，10μL 试剂四。工作液需现配现用。

NADPH 标准品：临用前配制，加 1mL 去离子水，充分溶解得到 2,000μM 标准品，未用完的已溶解的 NADPH 标准品可 4℃ 保存一周。若需长期保存，请分装后-20℃ 保存，避免反复冻融。

标准曲线设置：按下表所示，用去离子水将 2,000 μM 标准品稀释为 2,000、1,000、500、250、125、62.5、31.25 μM 的标准溶液。

| | 标准品体积 | 去离子水体积 (μL) | 标准品浓度 (μM) |
|--------|---------------------------|-------------|------------|
| Std. 1 | 200μL 2,000μM | 0 | 2,000 |
| Std. 2 | 100μL of Std. 1 (2,000μM) | 100 | 1,000 |
| Std. 3 | 100μL of Std. 2 (1,000μM) | 100 | 500 |
| Std. 4 | 100μL of Std. 3 (500μM) | 100 | 250 |
| Std. 5 | 100μL of Std. 4 (250μM) | 100 | 125 |
| Std. 6 | 100μL of Std. 5 (125μM) | 100 | 62.5 |
| Std. 7 | 100μL of Std. 5 (62.5μM) | 100 | 31.25 |

注意：每次实验，请使用新配制的标准品。

样本制备

1. 动物组织：称取约 0.1g 样本，加入 1mL 提取液，冰浴匀浆，8,000g，4℃离心 10min，取上清液置冰上待测。
2. 植物组织：称取约 0.1g 样本，加入 1mL 提取液捣碎，冰浴超声波破碎 5min（功率 20%或 200W，超声 3s，间隔 7s，重复 30 次），8,000g，4℃离心 10min，取上清液，置冰上待测。
3. 细胞或细菌：收集 500 万细胞或细菌到离心管内，用冷 PBS 清洗细胞，离心后弃上清，加入 1mL 提取液，冰浴超声波破碎细胞或细菌 5min（功率 20%或 200W，超声 3s，间隔 7s，重复 30 次），然后 8,000g，4℃离心 10min，取上清液，置冰上待测。
4. 血清（浆）：直接测定。

注意：1. 推荐使用新鲜样本，如果不立即进行实验，样本可在-80℃保存 1 个月。如需测定蛋白浓度，推荐使用 BCA 法蛋白质定量试剂盒进行样本蛋白质浓度测定。

2. 对于脂肪含量较高的动物组织，离心后移除上层脂肪，再取上清液。

实验步骤

1. 酶标仪或分光光度计预热 30min 以上，调节波长到 450nm，分光光度计去离子水调零。
2. 工作液 37℃（哺乳动物）或 25℃（其他物种）预热 10min。
3. 测定孔在 96 孔板或微量玻璃比色皿中依次加入 10μL 样本和 190 μL 工作液；充分混匀后，立即记录 450nm 处 20s 时的吸光值 A_1 ，迅速置于 37℃（哺乳动物）或 25℃（其他物种）准确反应 5min（酶标仪有控温功能可将温度调至对应温度），记录 5min20s 时的吸光值 A_2 ，计算 $\Delta A_{\text{测}}=A_2-A_1$ 。
4. 标准孔在 96 孔板或微量玻璃比色皿中依次加入 10μL 不同浓度标准品和 190 μL 工作液；空白孔在 96 孔板或微量玻璃比色皿中依次加入 10μL 去离子水和 190 μL 工作液充分混匀后，室温孵育 5min，测定 450nm 处的吸光值，计算 $\Delta A_{\text{标}}=A_{\text{标准}}-A_{\text{空白}}$ 。

注意：1. 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 ΔA 小于 0.001，可适当加大样本量。如果 ΔA 大于 1.5，样本可用提取液进一步稀释（计算结果乘以稀释倍数），或减少提取用样本量。

2. 测定反应的温度对测定结果有影响，请控制在 25℃（一般物种）或者 37℃（哺乳动物）。

3. 因通过反应速率计算酶活，使用 96 孔板时请根据操作速度控制一次测定的样本数（通常一次测定 4-8 个样本），或使用多道移液器且分批进行测定，以保证样本反应时间统一。

结果计算

1. 标准曲线的绘制

以标准液浓度为 y 轴， $\Delta A_{\text{标}}$ 为 x 轴，绘制标准曲线（浓度为 y 轴更方便计算结果）。将 $\Delta A_{\text{测}}$ 带入方程得到 y 值（1μM=1 nmol/mL）即 NADPH 含量。

2. HK 活性计算

（1）按样本蛋白浓度计算

单位的定义：每 mg 组织蛋白在反应体系中每分钟生成 1nmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{HK (U/mg prot)} = y \times V_{\text{反应}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \times n = 4y \div C_{\text{pr}} \times n$$

（2）按样本鲜重计算

产品说明书

单位的定义：每 g 组织在反应体系中每分钟生成 1nmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$HK (U/g \text{ 鲜重}) = y \times V_{\text{反应}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T \times n = 4y \div W \times n$$

(3) 按细菌或细胞数量计算

单位的定义：每 1 万个细菌或细胞在反应体系中每分钟生成 1nmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$HK (U/10^4 \text{ cell}) = y \times V_{\text{反应}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times 500) \div T \times n = 0.008y \times n$$

(4) 按液体样本体积计算

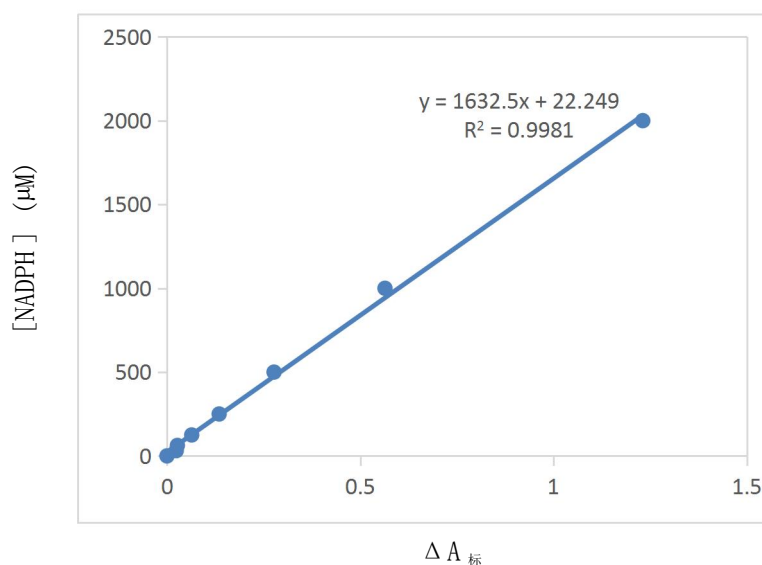
单位的定义：每毫升液体样本在在反应体系中每分钟生成 1nmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$HK (U/mL) = y \times V_{\text{反应}} \div V_{\text{样}} \div T \times n = 4y \times n$$

$V_{\text{反应}}$ ：反应体系总体积，0.2mL； $V_{\text{样}}$ ：加入样本体积，0.01mL； $V_{\text{样总}}$ ：加入提取液体积，1mL； C_{pr} ：样本蛋白质浓度，mg/mL； T ：反应时间，5min； n ：样本稀释倍数； W ：样品质量，g；500：细菌或细胞总数，500 万。

结果展示

典型标准曲线-以下数据和曲线仅供参考，实验者需根据自己的实验建立标准曲线。



注意事项

1. 实验过程中请穿戴实验服、口罩和乳胶手套。请按照生物实验室的国家安全规定进行实验，尤其是在检测血样或其他体液时。
2. 本试剂盒仅用于实验室科学研究，如果本试剂盒用于临床诊断或任何其他用途，我们将不对任何后果负责。
3. 本试剂盒应在有效期内使用，并请严格按照说明书进行存储。
4. 不同批次号、不同厂家之间的组分不要混用；否则，可能导致结果异常。
5. 勤换吸头，避免各组分之间的交叉污染。

相关产品：

- PMK1116 丙酮酸 (PA) 检测试剂盒 (微量法)
- PMK1121 丙酮酸激酶 (PK) 检测试剂盒 (微量法)
- PMK1122 磷酸果糖激酶 (PFK) 检测试剂盒 (微量法)
- PMK1123 磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 (PEPC) 检测试剂盒 (微量法)

更多产品详情了解，请关注公众号：

