己糖激酶(hexokinase，HK)试剂盒说明书

(微板法 48 样)

一、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，是糖酵解途径的限速酶之一，

己糖激酶磷酸化葡萄糖并产生 6-磷酸葡萄糖，该产物进一步与 6-磷酸葡萄糖脱氢酶和 NADP 偶联，在 340 nm 测 NADPH 光吸收增加量，进而计算出己糖激酶的活性，

二、试剂盒的组成和配制：

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 60mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 12mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉剂μg×1 支	-20℃保存	临用前甩几下或离心使粉剂落入底部，再加 0.65mL 蒸馏水溶解备用，
试剂三	粉剂 mg×1 瓶	4℃保存	临用前甩几下或离心使粉剂落入底部，再加 10mL 试剂一溶解备用。

三、所需的仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、恒温水浴锅、台式离心机、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水，

四、己糖激酶(HK)活性测定：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

1、样本制备：

① 组织样本：称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液，进行冰浴匀浆。12000rpm，4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可以按照组织质量(g)：提取液体积(mL)为 1:5~10 的比例提取，

② 细菌/细胞样本：先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；取 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液；冰浴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）；12000rpm，4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照细菌或细胞数量(10^4个)：提取液体积(mL)为 500~1000:1 比例进行提取。

③ 液体样本：直接检测。若浑浊，离心后取上清检测。

2、上机检测：

① 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 340nm，

② 配置好的试剂二和三可放在 37℃水浴 5-15min。

③ 试剂二和三可按照 10:170 比例配成混合液（一枪加 180μL 该混合液）（该混合液用多少配多少，现配现用）。

④ 在 96 孔板中依次加入：

试剂（μL）	测定管
样本	20
试剂二	10
试剂三	170
混匀，37℃条件下，1min 时于 340nm 处读取吸光值 A1，21min（即 20min 后）读取 A2，△A=A2-A1。	

【注】1.若△A 小于 0.01，可以适当延长反应时间 T（如延长至 31min 或更长读取 A2）；或

适当加大样本量 V1（如由 20μL 增至 50μL，则试剂三相应减少）；或增加取样质量 W。则改变后的 T 和 V1 和 W 需代入计算公式重新计算。

2.若上升趋势不稳定，可以每隔 10S 读取一次吸光值，选取一段线性上升的时间段来参与计算，相对应的 A 值也代入计算公式重新计算。

五、结果计算：

1、按样本蛋白浓度计算：

单位定义：每毫克组织蛋白每分钟生成 1 nmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

己糖激酶(HK) (nmol/min/mg prot)=[ΔA÷(ε×d)×V2×10^9]÷(V1×Cpr)÷T=160.77×ΔA÷Cpr

2、按样本鲜重计算：

单位定义：每 g 组织每分钟生成 1 nmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

己糖激酶(HK) (nmol/min/g 鲜重)=[ΔA÷(ε×d)×V2×10^9]÷(W×V1÷V)÷T=160.77×ΔA÷W

3、按细菌或细胞密度计算：

单位定义：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，

己糖激酶(HK) (nmol/min/10^4 cell)=[ΔA÷(ε×d)×V2×10^9]÷(500×V1÷V)÷T=0.32×ΔA

4、按液体体积计算：

单位定义：每毫升液体在每分钟生成 1 nmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位，

己糖激酶(HK) (nmol/min/mL)=[ΔA×V 反总÷(ε×d)×10^9]÷V1÷T=160.77×ΔA

ε---NADPH 摩尔消光系数，6.22×10^3 L / mol /cm； d---96 孔板光径，0.5cm；

V---加入提取液体积，1 mL； V1---加入样本体积，0.02 mL；

V2---反应体系总体积，2×10^{-4} L； T---反应时间，20min；

W---样本质量，g； 500---细菌或细胞总数，万；

Cpr---样本蛋白质浓度，mg/mL；建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒，