甘油激酶（GK）活性测定试剂盒说明书

（微板法 96 样）

一、产品简介：

甘油激酶（GK，EC 2.7.1.30）是甘油代谢中的限速酶，催化甘油磷酸化产生 3-磷酸甘油，3-磷酸甘油在 3-磷酸甘油脱氢酶的作用下产生磷酸二羟丙酮，进入糖酵解途径氧化分解释放能量。该酶的缺乏将直接导致细胞不能利用甘油。

本试剂盒采用甘油激酶催化 Mg-ATP 依赖的甘油磷酸化为 3-磷酸甘油，3-磷酸甘油在磷酸甘油氧化酶的作用下产生过氧化氢，过氧化氢与显色剂反应在 510nm 处有最大吸收峰。通过测定 510nm 处的增加速率即可得出甘油激酶的酶活力大小。

二、试剂盒组成和配制：

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 100mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉剂 mg×1 支	-20℃保存	用前甩几下或离心使粉剂落入底部，临用前加 1.1mL 蒸馏水溶解备用。用不完的试剂 4℃保存。
试剂二	粉剂 mg×1 支	-20℃保存	用前甩几下或离心使粉剂落入底部，临用前加 1.1mL 蒸馏水溶解备用。用不完的试剂 4℃保存。
试剂三	液体 6mL×1 瓶	4℃保存	
试剂四	液体 9mL×1 瓶	4℃保存	
试剂五	液体μL×1 支	4℃保存	用前甩几下或离心使试剂落入底部，临用前加 2.2mL 蒸馏水溶解备用。用不完的试剂 4℃保存。
标准品	液体 1 mL×1 支	4℃保存	若重新做标曲，则用到该试剂

三、所需的仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、可调试移液器、台式离心机、水浴锅、研钵、冰和蒸馏水。

四、甘油激酶（GK）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：取约 0.1g 组织（水分充足的样本可取 0.5g）到研钵内，加入 1mL 提取液，在冰上进行冰浴匀浆或者液氮研磨。12000rpm，4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

【注】：也可以按照组织质量（g）：提取液体积(mL)为 1：5~10 的比例提取）

② 细菌/真菌样本：先收集细菌/真菌到离心管内，离心后弃上清；取 500 万细菌/真菌加入 1mL 提取液；冰浴超声波破碎细菌/真菌（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】：也可按照细菌或细胞数量（10^4 个）：提取液体积（mL）为 500~1000：1 的比例进行提取）

③ 液体样本：澄清的液体样本直接检测，若浑浊则离心后取上清液检测。

2、上机检测：

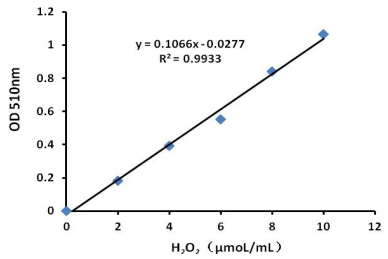
① 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 510nm。

② 在 96 孔板中依次加入下列试剂：

试剂名称（μL）	测定管
样本	10
试剂一	10
试剂二	10
试剂三	60
试剂四	90
混匀，37℃避光静止 5min。	
试剂五	20
混匀，37℃下，立即于 510nm 读取吸光值 A1，避光孵育 5min 后读取 A2。ΔA=A2-A1。	

五、结果计算：

1、标准曲线：y = 0.1066x-0.0277：x 为 H_2O_2 标准品浓度(μmoL/mL)，y 为ΔA。



2、按样本鲜重计算：

酶活定义：每克组织每分钟催化生成 1μmoLH_2O_2 定义为一个酶活单位（U）。

GK(μmoL/min/g 鲜重)=[(ΔA+0.0277)÷0.1066×V1]÷(W×V1÷V)÷T =1.88×(ΔA+0.0277)÷W

3、按样本蛋白浓度计算：

酶活定义：每毫克组织蛋白每分钟催化生成 1μmoLH_2O_2 定义为一个酶活单位（U）。

GK(μmoL/min/mg prot)=[(ΔA+0.0277)÷0.1066×V1]÷(V1×Cpr)÷T=1.88×(ΔA+0.0277)÷Cpr

4、按细胞数量计算：

酶活定义：每 10^4 个细胞每分钟催化生成 1μmoLH_2O_2 定义为一个酶活单位（U）。

GK(μmoL/min/104cell)=[(ΔA+0.0277)÷0.1066×V1]÷(500×V1÷V)÷T=0.004×(ΔA+0.0277)

5、按液体体积计算：

酶活定义：每毫升液体每分钟催化生成 1μmoLH_2O_2 定义为一个酶活单位（U）。

GK(μmoL/min/mL)= [(ΔA+0.0277)÷0.1066×V1]÷V1÷T=1.88×(ΔA+0.0277)

V---加入提取液体积，1 mL；　　V1---加入样本体积，0.01mL；

T---反应时间，5 min；　　W---样本质量；　　500---细胞数量；

Cpr---样本蛋白质浓度，mg/mL；建议使用本公司的蛋白含量测定试剂盒。

附：标准曲线制作过程：

1. 用蒸馏水把母液（250mM）稀释成以下浓度梯度的标准品：0,2,4,6,8,10mM。也可根据实际情况来调整标准品浓度。
2. 以上面不同浓度点为横坐标（x），对应的ΔA 标准为纵坐标（y）绘制标准曲线，得到线性回归方程 y=kx+b，将ΔA 测定带入公式中计算 x（μmoL/mL）。