

## 己糖激酶（HK）活性检测试剂盒说明书

微量法

**注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。**

货号：AC10199

规格：100T/96S

**产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系本公司工作人员。**

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

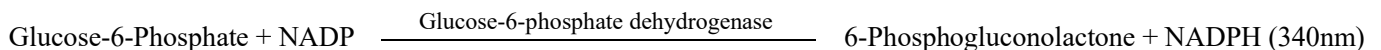
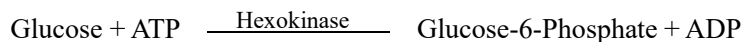
溶液的配制：

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）的比例配制成试剂二，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。

**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。



**注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。**

**需自备的仪器和用品：**

紫外分光光度计/酶标仪、水浴锅/恒温培养箱、台式离心机、可调式移液器、微量石英比色皿/96孔UV板、研钵/匀浆器/细胞超声破碎仪、冰和蒸馏水。

**操作步骤：**

## 一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

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℃（哺乳动物）或25℃（其它物种）预热10min。
- 3、加样表：

试剂名称	测定管
试剂二（ $\mu\text{L}$ ）	180
试剂三（ $\mu\text{L}$ ）	10
样本（ $\mu\text{L}$ ）	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℃（哺乳动物）或25℃（其它物种）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 $\Delta A = A_2 - A_1$ 。

## 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。

$$\text{HK活性 (U/mL)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 643 \times \Delta A$$

#### 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。

$$\text{HK活性 (U/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 643 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

##### (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。

$$\text{HK活性 (U/g 质量)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 643 \times \Delta A \div W$$

##### (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。

$$\text{HK活性 (U/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1.286 \times \Delta A$$

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；500：细菌或细胞总数，500万。

### 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) = $[\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 1071.7 \times \Delta A$

## 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) = $[\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 1071.7 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$

### (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) = $[\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1071.7 \times \Delta A \div W$

### (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) = $[\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 2.143 \times \Delta A$

V反总：反应体系总体积，2×10<sup>-4</sup>L；ε：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；500：细菌或细胞总数，500万。

## 注意事项：

1. 比色皿中反应液的温度必须保持 37°C（哺乳动物）或 25°C（其它物种），取小烧杯一只装入一定量的 37°C 或 25°C 蒸馏水，将此烧杯放入 37°C 或 25°C 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。

## 相关发表文献：

[1] Geng M T, Yao Y, Wang Y L, et al. Structure, expression, and functional analysis of the hexokinase gene family in cassava[J]. International journal of molecular sciences, 2017, 18(5): 1041.

[2] Zhou F, Du J, Wang J. Albendazole inhibits HIF-1α-dependent glycolysis and VEGF expression in non-small cell lung cancer cells[J]. Molecular and cellular biochemistry, 2017, 428(1-2): 171-178.

[3] Liu Y, Liang X, Zhang G, et al. Galangin and pinocembrin from propolis ameliorate insulin resistance in HepG2 cells via regulating Akt/mTOR signaling[J]. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2018, 2018.

[4] Jing Li, Yabing Duan, Chuanhong Bian, et al. Effects of validamycin in controlling Fusarium head blight caused by Fusarium graminearum: Inhibition of DON biosynthesis and induction of host resistance. Pesticide Biochemistry and Physiology. January 2019;153:152-160.(IF2.87)

## 参考文献：

[1] Pancera S M, Gliemann H, Schimmel T, et al. Adsorption behavior and activity of hexokinase[J]. Journal of colloid and interface science, 2006, 302(2): 417-423.

## 相关系列产品：

AC10162/AC10163 丙酮酸激酶（PK）活性检测试剂盒

AC10160/AC10161 磷酸果糖激酶（PFK）活性检测试剂盒

AC10399/AC10400 磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶（PEPC）活性检测试剂盒