

## 己糖激酶(hexokinase, HK)试剂盒说明书

分光光度法 50 管/48 样

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

### 测定意义

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。

### 测定原理

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。

### 需自备的仪器和用品

紫外分光光度计、恒温水浴锅、台式离心机、可调式移液器、1 mL 石英比色皿、研钵、冰和蒸馏水。

### 试剂的组成和配制

提取液: 60mL×1 瓶, 4℃ 保存;

试剂一: 液体 30mL×1 瓶, 4℃ 保存;

试剂二: 粉剂×1 瓶, 4℃ 保存; 临用前加入 30mL 蒸馏水充分溶解备用; 用不完的试剂分装后-20℃ 保存, 禁止反复冻融。

试剂三: 液体 5 mL×1 瓶, 4℃ 保存;

试剂四: 粉剂×1 支, -20℃ 保存, 临用前加入 4mL 蒸馏水充分溶解备用; 用不完的试剂分装后-20℃ 保存, 禁止反复冻融。

试剂五: 粉剂×1 支, -20℃ 保存; 临用前加入 2mL 蒸馏水充分溶解备用; 用不完的试剂分装后-20℃ 保存, 禁止反复冻融。

试剂六: 粉剂×1 支, -20℃ 保存; 临用前加入 250 μL 试剂一和 250 μL 蒸馏水充分溶解备用; 用不完的试剂分装后-20℃ 保存, 禁止反复冻融。

### 样本的前处理

1、细菌或培养细胞: 先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 20% 或 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) 样品: 直接检测。

### 测定步骤

1、分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 340nm, 蒸馏水调零。

2、将试剂一、二、三、四和五 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其它物种) 预热 10 分钟。

3、加样表:

试剂名称 (μL)	测定管
试剂一	400
试剂二	400
试剂三	80

试剂四	80
试剂五	40
试剂六	8
样本	30

将上述试剂按顺序加入 1 mL 石英比色皿中，立即混匀，加样本的同时开始计时，在 340 nm 波长下记录 20 秒时的初始吸光度 A1 和 5 分 20 秒时的吸光度 A2，计算  $\Delta A = A_2 - A_1$ 。

### 注意事项

- 1、为了减小操作误差，建议将试剂一、二、三、四、五按比例配成混合液，预热 10min，取 30 $\mu$ L 样本+8 $\mu$ L 试剂六+1mL 混合液，混匀后按照上述步骤检测。
- 2、不同匀浆组织中 HK 活力不一样，做正式试验之前请做 1-2 只预试，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（计算公式中乘以相应稀释倍数），或缩短反应时间至 2min,使  $\Delta A < 0.5$ ，以提高检测灵敏度。

### HK 活性计算

#### 1、血清（浆）HK 活性

单位的定义：每毫升血清（浆）在每分钟生成 1 nmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{HK (nmol/min/mL)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 1113 \times \Delta A$$

#### 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 1 nmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{HK (nmol/min /mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 1113 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

##### （2）按样本鲜重计算

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

$$\text{HK (nmol/min /g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1113 \times \Delta A \div W$$

##### （3）按细菌或细胞密度计算

单位的定义：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。

$$\text{HK (nmol/min /10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 2.226 \times \Delta A$$

V 反总：反应体系总体积，1.038 $\times 10^{-3}$  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，0.03 mL；V 样总：加入提取液体积，1 mL；

T：反应时间，5 min；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。