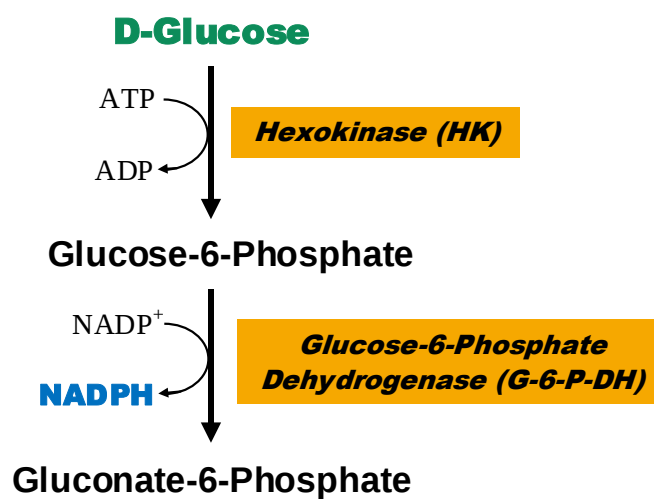




己糖激酶 (HK) 活性检测试剂盒
Hexokinase (HK) Activity Assay Kit



北京盒子生工科技有限公司
Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.



己糖激酶（HK）活性检测试剂盒

Hexokinase (HK) Activity Assay Kit

一、产品描述

己糖激酶（Hexokinase）广泛存在于动植物、微生物和培养细胞中，是糖酵解途径中控制葡萄糖代谢速率的第一个关键酶，可催化葡萄糖转化为 6-磷酸葡萄糖，在机体代谢过程中发挥着重要作用。

己糖激酶可催化葡萄糖和 ATP 生成葡萄糖-6-磷酸（G-6-P）和 ADP，葡萄糖-6-磷酸脱氢酶（G-6-PD）可催化葡萄糖-6-磷酸脱氢生成 6-磷酸葡萄糖酸（6-PGA），同时使 NADP^+ 还原成 NADPH，NADPH 在 340 nm 处具有特征吸收峰，通过吸光值变化即可表征己糖激酶的活性。

二、产品内容

名称	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液	液体 120 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂一	液体 25 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂二	粉剂×1 支	-20°C 避光保存	使用前加入 1 mL 试剂一充分溶解 (可分装后-20°C 保存，避免反复冻融)
试剂三	粉剂×1 瓶	-20°C 避光保存	使用前加入 20 mL 试剂一充分溶解 (可分装后-20°C 保存，避免反复冻融)
试剂四	液体 20 mL×1 瓶	4°C 保存	-
HK 工作液的制备（现用现配）： 根据使用量按试剂二：试剂四= 1:19 的体积比配置。			

三、产品使用说明

测定过程中所需要的仪器和试剂：紫外分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿（光径=1 cm）/96 孔 UV 板、研钵/匀浆器、可调式移液器/多道移液器、台式离心机、恒温水浴/培养箱和蒸馏水。

1. 粗酶液的制备（可根据预实验结果适当调整样本量和比例）

①细菌或细胞：离心收集细菌或细胞至离心管内，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 1 mL 提取液）处理样品，冰浴超声破碎（功率 20%或 200 W，超声 3 s，间隔 10 s，重复 30 次），4°C 8000 g 离心 10 min，取上清置于冰上待测。

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 0.1 g 组织，加入 1 mL 提取液）处理样品，冰浴匀浆，4°C 8000 g 离心 10 min，取上清置于冰上待测。

③血清（浆）、培养液等液体样本：直接检测或适当稀释后再进行检测。

2.测定步骤

- ①紫外分光光度计/酶标仪预热 30 min 以上，调节波长至 340 nm，蒸馏水调零。
- ②试验前将**试剂三**恢复至室温后置于 37℃（哺乳动物）或 25℃（其他物种）预热 10 min。
- ③在微量石英比色皿或 96 孔 UV 板中依次加入下列试剂：

试剂	测定组 (μL)
粗酶液	10
HK 工作液	10
试剂三	180

吸光值测定：①立即充分混匀并开始计时，测定 20 s（总时间）时 340 nm 处吸光值，记为 A1；
②37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）准确反应 300 s，测定 320 s（总时间）时 340 nm 处吸光值，记为 A2；③计算 $\Delta A = A2 - A1$ 。

3.己糖激酶（HK）活性计算

3.1 使用 96 孔 UV 板测定的计算公式

①按细菌或细胞数量计算

单位定义：每 10^4 个细菌或细胞每分钟生成 1 nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{HK (U/10}^4\text{cell)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{样总}} \times 10^9}{\epsilon \times d_1 \times \text{细菌或细胞数量} \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{1286.17 \times \Delta A}{\text{细菌或细胞数量}}$$

②按组织蛋白浓度计算

单位定义：每 mg 组织蛋白每分钟生成 1 nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{HK (U/mg prot)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times 10^9}{\epsilon \times d_1 \times \text{Cpr} \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{1286.17 \times \Delta A}{\text{Cpr}}$$

③按组织样本质量计算

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

$$\text{HK (U/g)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{样总}} \times 10^9}{\epsilon \times d_1 \times W \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{1286.17 \times \Delta A}{W}$$

④按液体体积计算

单位定义：每 mL 液体样本每分钟生成 1 nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{HK (U/mL)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times 10^9}{\epsilon \times d_1 \times V_{\text{样}} \times T} = 1286.17 \times \Delta A$$

3.2 使用微量石英比色皿测定的计算公式

①按细菌或细胞数量计算

单位定义：每 10^4 个细菌或细胞每分钟生成 1 nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{HK (U/10}^4\text{cell)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{样总}} \times 10^9}{\epsilon \times d_2 \times \text{细菌或细胞数量} \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{643 \times \Delta A}{\text{细菌或细胞数量}}$$

②按组织蛋白浓度计算

单位定义：每 mg 组织蛋白每分钟生成 1 nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{HK (U/mg prot)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times 10^9}{\epsilon \times d_2 \times \text{Cpr} \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{643 \times \Delta A}{\text{Cpr}}$$

③按组织样本质量计算

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

$$\text{HK (U/g)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{样总}} \times 10^9}{\epsilon \times d_2 \times W \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{643 \times \Delta A}{W}$$

④按液体体积计算

单位定义：每 mL 液体样本每分钟生成 1 nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{HK (U/mL)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times 10^9}{\epsilon \times d_2 \times V_{\text{样}} \times T} = 643 \times \Delta A$$

注释： V 样：反应体系中加入粗酶液的体积，0.01 mL；V 样总：粗酶液总体积，1 mL；V 反总：体系总体积， 2×10^{-4} L； ϵ ：NADPH 摩尔消光系数， 6.22×10^3 L/mol/cm； d_1 ：96 孔 UV 板光径，0.5 cm； d_2 ：微量石英比色皿光径，1 cm；细菌或细胞数量：以万计；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；W：样本质量，g；T：反应时间，300 s=5 min。

四、注意事项

①测定过程中粗酶液和 HK 工作液需置于冰上保存以免失活；

②准确在相应时间点完成测定，若使用 96 孔 UV 板进行测定，建议使用多道移液器且分批进行测定，以保证组间反应时间统一；

③若 $\Delta A > 0.5$ 建议将粗酶液使用提取液适当稀释或缩短反应时间至 2 min 后再进行测定，使 $\Delta A < 0.5$ 以提高检测灵敏度，计算时相应修改；

④为保证结果准确且避免试剂损失，测定前请仔细阅读说明书（以实际收到说明书内容为准），确认试剂储存和准备是否充分，操作步骤是否清楚，且务必取 2-3 个预期差异较大的样本进行预测定，过程中问题请您及时与工作人员联系。

For Research Use Only. Not for Use in Diagnostic Procedures.

