

己糖激酶（HK）检测试剂盒（微量法）

货号：PMK1120

保存：-20℃保存 12 个月

规格：48T/96T

适用样本：血清（浆）、动植物组织/细胞、细胞上清、细菌

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。本试剂盒可检测各种生物样本中己糖激酶（HK）活性，其原理是 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，生成的 NADPH 将 WST-8 还原生成橙黄色的 formazan（甲臜），在 450nm 左右检测有最大吸收峰。通过检测 450nm 处光吸收增加速率来计算该酶活性。

产品内容

试剂盒组分	规格		储存条件
	48T	96T	
提取液	50mL	100mL	4℃保存
试剂一	12mL	24mL	4℃保存
试剂二	1	1	4℃避光保存
试剂三	60μL	120μL	-20℃避光保存
试剂四	300μL	600μL	4℃避光保存
试剂五	60μL	120μL	4℃避光保存
NADPH 标准品	1	1	-20℃避光保存

自备耗材

酶标仪或可见分光光度计（能测 450nm 处的吸光度）及恒温培养箱
96 孔板或微量玻璃比色皿、移液枪及枪头
去离子水
匀浆器（如果是组织样本）

试剂准备

注意：各组分（小管试剂）开盖前，请先低速离心。

提取液：即用型；使用前，平衡到室温；4℃保存。

试剂一：即用型；使用前，平衡到室温；4℃保存。

试剂二：临用前配制，48T 加入 11mL 试剂一；96T 加入 22mL 试剂一，充分溶解。未用完的已溶解的试剂二可 4℃保存一周。若需长期保存，请分装后-20℃保存，避免反复冻融。

试剂三：即用型；使用前，平衡到室温；-20℃避光保存。

试剂四：即用型；使用前，平衡到室温；4℃避光保存。

试剂五：即用型；使用前，平衡到室温；4℃避光保存。

工作液的配制：每孔配制 190μL 工作液：吸取 183μL 试剂二，1μL 试剂三，5μL 试剂四，1μL 试剂五。工作液需现配现用。

产品说明书

NADPH 标准品: 临用前配制, 加 1mL 去离子水, 充分溶解得到 2,000 μ M 标准品, 未用完的已溶解的 NADPH 标准品可 4 $^{\circ}$ C 保存一周。若需长期保存, 请分装后-20 $^{\circ}$ C 保存, 避免反复冻融。

标准曲线设置: 按下表所示, 用去离子水将 2,000 μ M 标准品稀释为 2,000、1,000、500、250、125、62.5、31.25 μ M 的标准溶液。

	标准品体积	去离子水体积 (μ L)	标准品浓度 (μ M)
Std. 1	200 μ L 2,000 μ M	0	2,000
Std. 2	100 μ L of Std. 1 (2,000 μ M)	100	1,000
Std. 3	100 μ L of Std. 2 (1,000 μ M)	100	500
Std. 4	100 μ L of Std. 3 (500 μ M)	100	250
Std. 5	100 μ L of Std. 4 (250 μ M)	100	125
Std. 6	100 μ L of Std. 5 (125 μ M)	100	62.5
Std. 7	100 μ L of Std. 5 (62.5 μ M)	100	31.25

注意: 每次实验, 请使用新配制的标准品。

样本制备

1. 动物组织: 称取约 0.1g 样本, 加入 1mL 提取液, 冰浴匀浆, 8,000g, 4 $^{\circ}$ C 离心 10min, 取上清液置冰上待测。
2. 植物组织: 称取约 0.1g 样本, 加入 1mL 提取液捣碎, 冰浴超声波破碎 5min (功率 20%或 200W, 超声 3s, 间隔 7s, 重复 30 次), 8,000g, 4 $^{\circ}$ C 离心 10min, 取上清液, 置冰上待测。
3. 细胞或细菌: 收集 500 万细胞或细菌到离心管内, 用冷 PBS 清洗细胞, 离心后弃上清, 加入 1mL 提取液, 冰浴超声波破碎细胞或细菌 5min (功率 20%或 200W, 超声 3s, 间隔 7s, 重复 30 次), 然后 8,000g, 4 $^{\circ}$ C 离心 10min, 取上清液, 置冰上待测。
4. 血清 (浆): 直接测定。

注意: 1. 推荐使用新鲜样本, 如果不立即进行实验, 样本可在-80 $^{\circ}$ C 保存 1 个月。如需测定蛋白浓度, 推荐使用 BCA 法蛋白质定量试剂盒进行样本蛋白质浓度测定。

2. 对于脂肪含量较高的动物组织, 离心后移除上层脂肪, 再取上清液。

实验步骤

1. 酶标仪或可见分光光度计预热 30min 以上, 调节波长到 450nm, 可见分光光度计去离子水调零。
2. 测定孔在 96 孔板或微量玻璃比色皿中依次加入 10 μ L 样本和 190 μ L 工作液; 充分混匀后, 立即记录 450nm 处 20s 时的吸光值 A_1 和 5min20s 后的吸光值 A_2 , 计算 $\Delta A_{\text{测}}=A_2-A_1$ 。
3. 标准孔在 96 孔板或微量玻璃比色皿中依次加入 10 μ L 不同浓度标准品和 190 μ L 工作液; 空白孔在 96 孔板或微量玻璃比色皿中依次加入 10 μ L 去离子水和 190 μ L 工作液充分混匀后, 室温孵育 5min, 测定 450nm 处的吸光值, 计算 $\Delta A_{\text{标}}=A_{\text{标准}}-A_{\text{空白}}$ 。

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 $\Delta A > 1.5$, 则说明样本酶活力太高, 必须用提取液稀释成适当浓度。(计算公式中乘以相应稀释倍数)

结果计算

1. 标准曲线的绘制

以标准液浓度为 y 轴, $\Delta A_{\text{标}}$ 为 x 轴, 绘制标准曲线 (浓度为 y 轴更方便计算结果)。将 $\Delta A_{\text{测}}$ 带入方程得到 y 值 (1 μ M=1 nmol/mL) 即 NADPH 含量。

2. HK 活性计算

(1) 按样本蛋白浓度计算

单位的定义: 每 mg 组织蛋白在反应体系中每分钟生成 1nmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{HK (U/mg prot)} = y \times V_{\text{反应}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T \times n = 4y \div \text{Cpr} \times n$$

(2) 按样本鲜重计算

单位的定义: 每 g 组织蛋白在反应体系中每分钟生成 1nmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

产品说明书

$$HK (U/g \text{ 鲜重}) = y \times V_{\text{反应}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) T \times n = 4y \div W \times n$$

(3) 按细菌或细胞数量计算

单位的定义：每 1 万个细菌或细胞在反应体系中每分钟生成 1nmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$HK (U/10^4 \text{ cell}) = y \times V_{\text{反应}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times 500) \div T \times n = 0.008y \times n$$

(4) 按液体样本体积计算

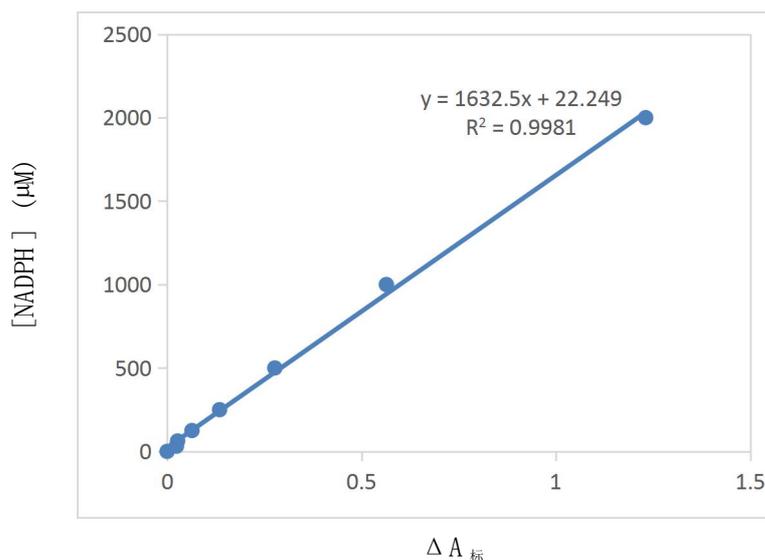
单位的定义：每毫升液体样本在在反应体系中每分钟生成 1nmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$HK (U/mL) = y \times V_{\text{反应}} \div V_{\text{样}} \div T \times n = 4y \times n$$

$V_{\text{反应}}$ ：反应体系总体积，0.2mL； $V_{\text{样}}$ ：加入样本体积，0.01mL； $V_{\text{样总}}$ ：加入提取液体积，1mL； C_{pr} ：样本蛋白质浓度，mg/mL； T ：反应时间，5min； n ：样本稀释倍数； W ：样品质量，g；500：细菌或细胞总数，500 万。

结果展示

典型标准曲线-以下数据和曲线仅供参考，实验者需根据自己的实验建立标准曲线。



注意事项

1. 实验过程中请穿戴实验服、口罩和乳胶手套。请按照生物实验室的国家安全规定进行实验，尤其是在检测血样或其他体液时。
2. 本试剂盒仅用于实验室科学研究，如果本试剂盒用于临床诊断或任何其他用途，我们将不对任何后果负责。
3. 本试剂盒应在有效期内使用，并请严格按照说明书进行存储。
4. 不同批次号、不同厂家之间的组分不要混用；否则，可能导致结果异常。
5. 勤换吸头，避免各组分之间的交叉污染。

相关产品：

- PMK1116 丙酮酸 (PA) 检测试剂盒 (微量法)
- PMK1121 丙酮酸激酶 (PK) 检测试剂盒 (微量法)
- PMK1122 磷酸果糖激酶 (PFK) 检测试剂盒 (微量法)
- PMK1123 磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 (PEPC) 检测试剂盒 (微量法)

更多产品详情了解，请关注公众号：

