

己糖激酶（HK）活性检测试剂盒说明书

紫外分光光度法

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：AC10198

规格：50T/48S

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 60 mL×1 瓶	4°C保存
试剂一	液体 30 mL×1 瓶	4°C保存
试剂二	粉剂×1 瓶	4°C保存
试剂三	液体 5 mL×1 瓶	4°C保存
试剂四	粉剂×1 支	-20°C保存
试剂五	粉剂×1 瓶	-20°C保存
试剂六	粉剂×2 支	-20°C保存

溶液的配制：

- 1、试剂二：临用前加入 30 mL 蒸馏水充分溶解备用；用不完的试剂 4°C保存一周；
- 2、试剂四：用时每支加入 4 mL 双蒸水充分溶解备用，用不完的试剂 4°C保存一周；
- 3、试剂五：用时每支加入 2 mL 双蒸水充分溶解备用，用不完的试剂 4°C保存一周；
- 4、试剂六：用时取 1 支加入 125 μ L 试剂一和 125 μ L 蒸馏水充分溶解备用，用不完的试剂 4°C保存一周。

产品说明：

HK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、恒温水浴锅、台式离心机、可调式移液器、1mL石英比色皿、研钵/匀浆器、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）

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 20% 或 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次），8000g 4°C离心 10min，取上清，置冰上待测。

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°C离心 10min，取上清，置冰上待测。

血清（浆）样本：直接检测。

二、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、四和五置于37°C（哺乳动物）或25°C（其他物种）预热10min。
- 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 1mL 石英比色皿中，立即混匀，加样本的同时开始计时，在 340nm 波长下记录 20 秒时的初始吸光度 A1，比色后迅速将比色皿连同反应液一起放入 37°C（哺乳动物）或 25°C（其它物种）水浴或恒温箱中，准确反应 5 分钟，迅速取出比色皿并擦干，340nm 下比色，记录 5 分 20 秒时的吸光度 A2，计算 $\Delta A = A2 - A1$ 。

三、HK 活性计算

1. 血清（浆）HK活力的计算：

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

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

2. 组织、细菌或细胞中HK活力计算：

- (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 NADPH定义为一个酶活力单位。

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

- (2) 按样本质量计算：

单位的定义：每g组织每分钟生成1nmol NADPH定义为一个酶活力单位。

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

- (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 NADPH定义为一个酶活力单位。

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

V反总：反应体系总体积， 1.038×10^{-3} L； ϵ ：NADPH摩尔消光系数， 6.22×10^3 L/mol/cm；d：比色皿光径，1cm；V样：加入样本体积，0.03mL；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. 如果一次性测定样本数较多，可将试剂一、二、三、四、五、六按比例配成混合液，预热 10min。
2. 比色皿中反应液的温度必须保持 37°C或 25°C，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。

3. 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。
4. 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 $\Delta A > 0.5$ ，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。

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-1 α -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.