

己糖激酶(HK)检测试剂盒（微量法）

注意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

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。

试剂组成和配制：

提取液：液体 100mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂一：液体 20mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂二：粉剂×1 瓶，4℃ 保存；

试剂三：粉剂×1 支，-20℃ 保存；

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、分光光度计或酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 340nm，蒸馏水调零。
- 2、样本测定
 - (1) 在试剂二中加入 18mL 试剂一充分溶解，置于 37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）水浴 5min；用不完的试剂分装后-20℃ 保存，禁止反复冻融。
 - (2) 在试剂三中加入 1mL 试剂一，充分溶解待用；用不完的试剂分装后-20℃ 保存，禁止反复冻融。
 - (3) 在微量石英比色皿或 96 孔板中加入 10 μ L 样本、10 μ L 试剂三和 180 μ L 试剂二，混匀，立即记录 340nm 处 20s 时的吸光值 A1 和 5min20s 后的吸光值 A2，计算 $\Delta A = A2 - A1$ 。

注意：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：

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 1 nmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

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

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 1 nmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

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

(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。

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

(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。

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

V 反总：反应体系总体积， 2×10^{-4} L；

d：比色皿光径，1cm；

V 样总：加入提取液体积，1 mL；

Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；

500：细菌或细胞总数，500 万。

ϵ ：NADPH 摩尔消光系数， 6.22×10^3 L / mol / cm；

V 样：加入样本体积，0.01 mL；

T：反应时间，5 min；

W：样本质量，g；

b.用 96 孔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 1 nmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{HK (nmol/min/mL)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T \\ = 1286 \times \Delta A$$

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。

$$\text{HK (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T \\ = 1286 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(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。

$$\text{HK (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ = 1286 \times \Delta A \div W$$

(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。

$$\text{HK (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ = 2.572 \times \Delta A$$

V 反总：反应体系总体积， 2×10^{-4} L；

d：96 孔板光径，0.5cm；

V 样总：加入提取液体积，1 mL；

Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；

500：细菌或细胞总数，500 万。

ϵ ：NADPH 摩尔消光系数， 6.22×10^3 L / mol / cm；

V 样：加入样本体积，0.01 mL；

T：反应时间，5 min；

W：样本质量，g；