

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：BC0740

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，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 60 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 30 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	粉剂×1 瓶	2-8℃保存
试剂三	液体 5 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂四	粉剂×1 瓶	-20℃保存
试剂五	粉剂×1 瓶	-20℃保存
试剂六	粉剂×2 支	-20℃保存

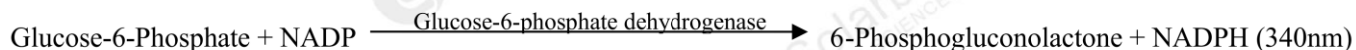
溶液的配制：

- 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 2-8℃保存 4 周；
- 2、试剂四：临用前加入 5mL 蒸馏水充分溶解备用，用不完的试剂-20℃分装保存 4 周；
- 3、试剂五：临用前加入 3mL 蒸馏水充分溶解备用，用不完的试剂-20℃分装保存 4 周；
- 4、试剂六：临用前取 1 支试剂六加入 125 μL 试剂一和 125 μL 蒸馏水充分溶解备用，用不完的试剂 2-8℃保存 2 周。（该试剂为冻干试剂，可能存在不同瓶间肉眼观察试剂量相差较大甚至量很少的现象，此现象不影响使用，实际质量相同）

产品说明：

己糖激酶（Hexokinase, 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。

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。

需自备的仪器和用品：

紫外分光光度计、水浴锅/恒温培养箱、台式离心机、可调式移液器、1mL石英比色皿、研钵/匀浆器/细胞超声破碎仪、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）

1. 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 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）等液体样本：直接检测。若有沉淀请离心后取上清待测。

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℃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，立即充分混匀后于 340nm 处测定 20s 时的吸光值 A1，迅速置于 37℃准确反应 5min，拿出迅速擦干测定 5min20s 时的吸光值 A2，记录 340nm 下 20s 时吸光值 A1 和 5min 后的吸光值 A2。计算 $\Delta A = A2 - A1$ 。

注：如果一次性测定样本数较多，可将试剂一、二、三、四、五按比例配成混合液，预热 10min 后使用。

三、HK 活性计算

1. 血清（浆）HK活性的计算：

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。

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

2. 组织、细菌或细胞中HK活性计算：

- (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。

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

- (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。

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

- (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。

$$\text{HK活性 (U/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (N \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1113 \times \Delta A \div N$$

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：1mL石英比色皿光径，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；N：细菌或细胞总数，以万计。



注意事项:

1. 1mL 石英比色皿中反应液的温度必须保持 37℃, 取小烧杯一只装入一定量的 37℃蒸馏水, 将此烧杯放入 37℃水浴锅中。在反应过程中把 1mL 石英比色皿连同反应液放在此烧杯中。
2. 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。
3. 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, 或缩短反应时间至 2min, 使 $\Delta A < 0.5$, 以提高检测灵敏度。注意同步修改计算公式。

实验实例:

1. 称取约 0.1g 鼠肾, 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆, 8000g, 4℃离心 10min, 取上清用提取液稀释 5 倍后置冰上待测。之后按照测定步骤操作, 用 1mL 石英比色皿测得计算 $A_1 = 0.2252$, $A_2 = 0.3084$, $\Delta A = A_2 - A_1 = 0.0832$, 计算己糖激酶活性得:
HK 活性 (U/g 质量) = $1113 \times \Delta A \div W \times \text{稀释倍数} = 4630.08 \text{ U/g 质量}$
2. 称取约 0.1g 绿萝, 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。之后按照测定步骤操作, 用 1mL 石英比色皿测得计算 $A_1 = 0.1949$, $A_2 = 0.2184$, $\Delta A = A_2 - A_1 = 0.0235$, 计算己糖激酶活性得:
HK 活性 (U/g 质量) = $1113 \times \Delta A \div W = 261.56 \text{ U/g 质量}$

相关发表文献:

- [1] Xu HL, Zhou X, Chen S, Xu S, Li Z, Nakanishi H, Gao XD. Rare sugar L-sorbose exerts antitumor activity by impairing glucose metabolism. *Commun Biol.* 2023 Mar 11;6(1):259. doi: 10.1038/s42003-023-04638-z. PMID: 36906698; PMCID: PMC10008635.
- [2] Lai T, Sun Y, Liu Y, Li R, Chen Y, Zhou T. Cinnamon Oil Inhibits *Penicillium expansum* Growth by Disturbing the Carbohydrate Metabolic Process. *J Fungi (Basel).* 2021 Feb 9;7(2):123. doi: 10.3390/jof7020123. PMID: 33572180; PMCID: PMC7915993.
- [3] Ji L, Shen W, Zhang F, Qian J, Jiang J, Weng L, Tan J, Li L, Chen Y, Cheng H, Sun D. Worenine reverses the Warburg effect and inhibits colon cancer cell growth by negatively regulating HIF-1 伪. *Cell Mol Biol Lett.* 2021 May 18;26(1):19. doi: 10.1186/s11658-021-00263-y. PMID: 34006215; PMCID: PMC8130299.
- [4] Wang C, Zhou J, Zhang S, Gao X, Yang Y, Hou J, Chen G, Tang X, Wu J, Yuan L. Combined Metabolome and Transcriptome Analysis Elucidates Sugar Accumulation in Wucai (*Brassica campestris* L.). *Int J Mol Sci.* 2023 Mar 2;24(5):4816. doi: 10.3390/ijms24054816. PMID: 36902245; PMCID: PMC10003340.
- [5] Wang H, Chen J, Guo R, Wang D, Wang T, Sun Y. Exogenous brassinolide treatment regulates phenolic accumulation in mung bean sprouts through the modulation of sugar and energy metabolism. *J Sci Food Agric.* 2024 Feb;104(3):1656-1667. doi: 10.1002/jsfa.13060. Epub 2023 Nov 6. PMID: 37851693.

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.
- [2] Galina A, da Silva WS. Hexokinase activity alters sugar-nucleotide formation in maize root homogenates[J]. Phytochemistry, 2000, 53(1): 29-37.

相关系列产品:

BC0540/BC0545 丙酮酸激酶 (PK) 活性检测试剂盒

BC0530/BC0535 磷酸果糖激酶 (PFK) 活性检测试剂盒

BC2190/BC2195 磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 (PEPC) 活性检测试剂盒

