

## 己糖激酶（HK）活性检测试剂盒说明书

微量法

**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：**BC0745

**规格：**100T/96S

**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 110 mL×1 瓶 | 2-8℃保存 |
| 试剂一   | 液体 25 mL×1 瓶  | 2-8℃保存 |
| 试剂二 A | 液体 3mL×1 瓶    | 2-8℃保存 |
| 试剂二 B | 粉剂×1 瓶        | 2-8℃保存 |
| 试剂二 C | 粉剂×1 瓶        | -20℃保存 |
| 试剂二 D | 粉剂×1 瓶        | -20℃保存 |
| 试剂三   | 粉剂×2 支        | -20℃保存 |

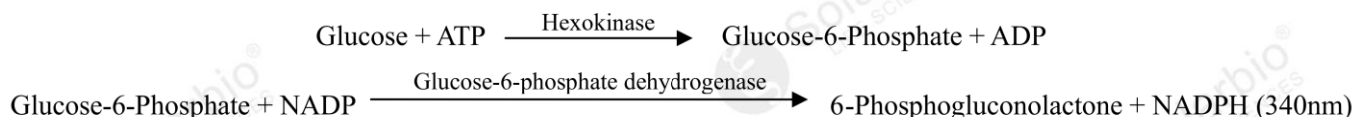
**溶液的配制：**

1. 试剂二 B：临用前加入 12mL 试剂一溶解，用不完的试剂 2-8℃分装保存 4 周；
2. 试剂二 C：临用前加入 4mL 试剂一溶解，用不完的试剂-20℃分装保存 4 周，避免反复冻融；
3. 试剂二 D：临用前加入 4mL 试剂一溶解，用不完的试剂-20℃分装保存 4 周，避免反复冻融；
4. **试剂二的配制：**根据样本量按试剂二 A：试剂二 B：试剂二 C：试剂二 D=100μL：500μL：150μL：150μL（5T）的比例配制成试剂二，现用现配；
5. 试剂三：临用前取 1 支，加入 0.5 mL 试剂一，充分溶解；用不完的试剂-20℃保存 2 周，避免反复冻融。（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：**

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/酶标仪、水浴锅/恒温培养箱、台式离心机、可调式移液器、微量石英比色皿/96孔UV板、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、紫外分光光度计或酶标仪预热30min以上，调节波长至340nm，紫外分光光度计蒸馏水调零。
- 2、试剂二临用前于37℃预热10min。
- 3、加样表：

| 试剂名称     | 测定管 |
|----------|-----|
| 试剂二 (μL) | 180 |
| 试剂三 (μL) | 10  |
| 样本 (μL)  | 10  |

将上述试剂按顺序加入微量石英比色皿或96孔UV板中，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（酶标仪有控温功能可将温度调至37℃），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 $\Delta A = A_2 - A_1$ 。

### 三、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1nmol的NADPH定义为一个酶活力单位。

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

##### 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1nmol的NADPH定义为一个酶活力单位。

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

###### (2) 按样本质量计算

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

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

###### (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的NADPH定义为一个酶活力单位。

$$\text{HK活性 (U/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (N \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 643 \times \Delta A \div N$$

V反总：反应体系总体积， $2 \times 10^{-4}$  L； $\epsilon$ ：NADPH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3$  L/mol/cm；d：微量石英比色皿光径，1cm；V样：加入样本体积，0.01mL；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。

#### B、用96孔UV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1nmol的NADPH定义为一个酶活力单位。

$$\text{HK活性 (U/mL)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 1071.7 \times \Delta A$$

## 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1nmol的NADPH定义为一个酶活力单位。

$$\text{HK活性 (U/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 1071.7 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

### (2) 按样本质量计算

单位的定义：每g组织每分钟生成1nmol的NADPH定义为一个酶活力单位。

$$\text{HK活性 (U/g 质量)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1071.7 \times \Delta A \div W$$

### (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的NADPH定义为一个酶活力单位。

$$\text{HK活性 (U/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (N \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1071.7 \times \Delta A \div N$$

V反总：反应体系总体积， $2 \times 10^{-4}$  L； $\epsilon$ ：NADPH摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3$  L/mol/cm；d：96孔UV板光径，0.6cm；V样：加入样本体积，0.01mL；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：

- 微量石英比色皿中反应液的温度必须保持 37°C，取小烧杯一只装入一定量的 37°C 蒸馏水，将此烧杯放入 37°C 水浴锅中。在反应过程中把微量石英比色皿连同反应液放在此烧杯中。
- 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。
- 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：

- 称取约 0.0508g 鼠肝，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。之后按照测定步骤操作，用 96 孔 UV 板测得计算  $A_1 = 0.183$ ， $A_2 = 0.428$ ， $\Delta A = A_2 - A_1 = 0.245$ ，计算己糖激酶活性得：  
 $\text{HK 活性 (U/g 质量)} = 1071.7 \times \Delta A \div W = 5168.632 \text{ U/g 质量}$ 。

## 相关发表文献：

- [1] Gao J, Wang Z, Guo Q, Tang H, Wang Z, Yang C, Fan H, Zhang W, Ren C, Liu J. Mitochondrion-targeted supramolecular "nano-boat" simultaneously inhibiting dual energy metabolism for tumor selective and synergistic chemo-radiotherapy. *Theranostics*. 2022 Jan 1;12(3):1286-1302. doi: 10.7150/thno.67543. PMID: 35154487; PMCID: PMC8771563.
- [2] Li M, Li H, Zhu Q, Liu D, Li Z, Chen H, Luo J, Gong P, Ismail AM, Zhang Z. Knockout of the sugar transporter OsSTP15 enhances grain yield by improving tiller number due to increased sugar content in the shoot base of rice (*Oryza sativa* L.). *New Phytol*. 2024 Feb;241(3):1250-1265. doi: 10.1111/nph.19411. Epub 2023 Nov 27. PMID: 38009305.





- [3] Feng H, Tan J, Wang Q, Zhou T, Li L, Sun D, Fan M, Cheng H, Shen W. 伪-hederin regulates glucose metabolism in intestinal epithelial cells by increasing SNX10 expression. *Phytomedicine*. 2023 Mar;111:154677. doi: 10.1016/j.phymed.2023.154677. Epub 2023 Jan 23. PMID: 36724620.
- [4] Han S, He Z, Hu X, Li X, Zheng K, Huang Y, Xiao P, Xie Q, Ni J, Liu Q. Inhibiting NLRP3 Inflammasome Activation by CY-09 Helps to Restore Cerebral Glucose Metabolism in 3×Tg-AD Mice. *Antioxidants (Basel)*. 2023 Mar 15;12(3):722. doi: 10.3390/antiox12030722. PMID: 36978970; PMCID: PMC10045645.

#### 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

