

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

产品货号：GBQ183

产品规格：96T(40 samples)

检测仪器：酶标仪(440-450 nm)

Elabscience®己糖激酶 (HK) 比色法测试盒

Hexokinase (HK) Activity Assay Kit

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话：400-999-2100

邮箱：biochemical@elabscience.cn

网址：www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。

联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

用途

本试剂盒适用于检测动物组织、细胞样本中的己糖激酶(HK)的酶活。

检测原理

己糖激酶是葡萄糖分解的关键酶，在不同的物种中都存在，是催化己糖磷酸化生成磷酸己糖的一类酶，也是碳水化合物代谢的关键酶之一。己糖激酶将葡萄糖转化为 6-磷酸葡萄糖，6-磷酸葡萄糖被酶催化转化，同时将 NAD⁺ 转化为 NADH, NADH 在电子耦合试剂的作用下将 WST-8 还原生成橙黄色物质，在 450 nm 左右有最大吸收峰。反应体系中生成橙黄色物质颜色深浅可以反映样品中己糖激酶酶活的高低。

本试剂盒检测组织或细胞样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用本公司 BCA 试剂盒(货号 GBQ162)进行测定。

提供试剂和物品

编号	名称	规格 (Size)(96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	缓冲液 (Buffer Solution)	25 mL×1 瓶	-20℃ 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	底物 (Substrate)	粉剂×1 瓶	-20℃ 避光 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	酶试剂 (Enzyme Reagent)	粉剂×1 支	-20℃ 避光 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	显色剂 (Chromogenic Agent)	3 mL×1 瓶	-20℃ 避光 保存 6 个月
试剂五 (Reagent 5)	0.8 mmol/L 标准品 (0.8 mmol/L Standard)	3.2 mL×1 瓶	-20℃ 避光 保存 6 个月
	96 孔酶标板	96 孔×1 块	无要求
	96 孔覆膜	2 张	
	样本位置标记表	1 张	

说明：试剂严格按上表中的保存条件保存，不同测试盒中的试剂不能混用。
对于体积较少的试剂，使用前请先离心，以免量取不到足够量的试剂。

所需自备物品

仪器：酶标仪(440-450 nm，最佳检测波长 450 nm)

试剂准备

① 检测前，试剂盒中的试剂平衡至室温。

② 试剂二工作液的配制：

取一瓶试剂二用12 mL试剂一溶解，充分混匀，确保固体粉末完全溶解。
未用完部分分装后-20℃避光保存两周。

③ 试剂三工作液的配制：

取一支试剂三用12 mL试剂一溶解，充分混匀，确保固体粉末完全溶解。
未用完部分分装后-20℃避光保存两周。

④ 酶工作液的配制：

取试剂二工作液：试剂三工作液按体积比1: 1混匀，按需配制，2-8℃避光保存12 h。

⑤ 测定反应液的配制：

取酶工作液：试剂四按体积比10: 1混匀，按需配制，2-8℃避光保存12 h。

⑥ 对照反应液的配制：

取双蒸水：试剂四按体积比10: 1混匀，按需配制，2-8℃避光保存12 h。

⑦ 不同浓度标准品的稀释：

编号	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
标准品浓度(mmol/L)	0	0.16	0.32	0.4	0.48	0.56	0.64	0.8
0.8 mmol/L 标准品(μL)	0	40	80	100	120	140	160	200
双蒸水(μL)	200	160	120	100	80	60	40	0

样本准备

① 样本处理

组织样本：匀浆介质为生理盐水(0.9% NaCl)，匀浆后离心取上清，留取部分样本上清用于蛋白浓度测定。

细胞样本：收集 5×10^6 个细胞加入200 μ L生理盐水(0.9% NaCl)，匀浆后离心后取上清待测，留取部分上清进行蛋白浓度测定。

② 样本的稀释

在正式检测前，需选择2-3个预期差异大的样本稀释成不同浓度进行预实验，根据预实验的结果，结合本试剂盒的线性范围：5.93-40.11 U/L，请参考下表稀释(仅供参考)：

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
10%小鼠脾组织	不稀释	10%小鼠肝组织	不稀释
10%小鼠肾组织	不稀释	10%小鼠心组织	2-6
10%小鼠脑组织	不稀释	10%大鼠脾组织	不稀释
10%大鼠肺组织	不稀释	10%大鼠肝组织	不稀释

注：稀释液为生理盐水(0.9% NaCl)。

实验关键点

试剂准备时，配制工作液时需确保试剂二完全溶解。

操作步骤

- ① 标准孔：取 10 μL 不同浓度标准品溶液加入相应的标准孔中；
对照孔：取 10 μL 待测样本加入对照孔中；
测定孔：取 10 μL 待测样本加入测定孔中。
- ② 向①中标准孔、测定孔加入 220 μL 测定反应液，
- ③ 向步骤②中对照孔加入 220 μL 对照反应液
- ④ 37℃ 下孵育 10 min。
- ⑤ 酶标仪 450 nm 波长下测定各孔 OD 值。

操作表

	标准孔	测定孔	对照孔
不同浓度的标准品溶液(μL)	10	--	
待测样本(μL)	--	10	10
测定反应液(μL)	220	220	
对照反应液(μL)			220
37℃ 下孵育 10 min，酶标仪 450 nm 波长下测定各孔 OD 值。			

本试剂盒检测组织或细胞样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用本公司 BCA 试剂盒(货号 GBQ162)进行测定。

结果计算

标准品拟合曲线： $y = ax + b$

组织与细胞样本中己糖激酶(HK)活力计算公式：

定义：37°C 条件下，每克蛋白每分钟催化底物产生 1 μmol 6-磷酸葡萄糖所需要的酶量为一个酶活单位。

$$\text{HK 活力 (U/gprot)} = (\Delta A_{450} - b) \div a \div T \times 1000 \div C_{\text{pr}} \times f$$

注解：

y: 标准品 OD 值-空白 OD 值(标准品浓度为 0 时的 OD 值)

x: 标准品的浓度

a: 标曲的斜率

b: 标曲的截距

ΔA_{450} : 测定孔 OD 值-对照孔 OD 值

C_{pr} : 待测样本的蛋白浓度, gprot/L

f: 样本加入检测体系前的稀释倍数

T: 37°C 孵育时间, 10 min

1000: 1 mmol = 1000 μmol

附录1 关键数据

1. 技术参数

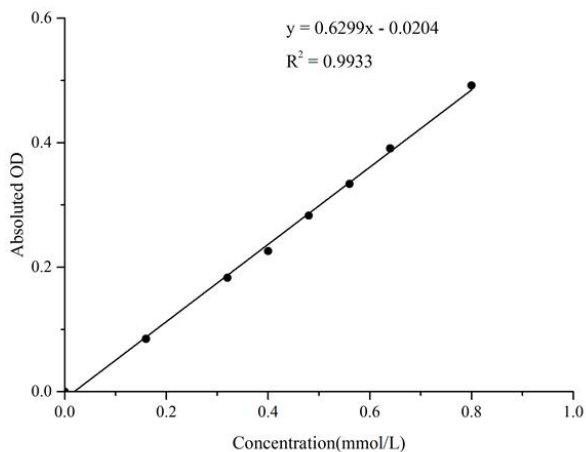
检测范围	5.93-40.11 U/L	平均批间差	9.1 %
灵敏度	5.93 U/L	平均批内差	3.3 %
平均回收率	99 %		

2. 标准曲线(数据仅供参考)

① 不同浓度标准品加样量10 μ L, 按照操作步骤进行实验, OD值如下表所示:

标准品浓度 (mmol/L)	0	0.16	0.32	0.4	0.48	0.56	0.64	0.8
OD 值	0.049	0.132	0.231	0.277	0.33	0.385	0.432	0.532
	0.049	0.136	0.232	0.272	0.333	0.38	0.447	0.55
平均 OD 值	0.049	0.132	0.232	0.275	0.332	0.383	0.440	0.541
绝对 OD 值	0	0.085	0.183	0.226	0.283	0.334	0.391	0.492

② 绘制标曲(如下图):



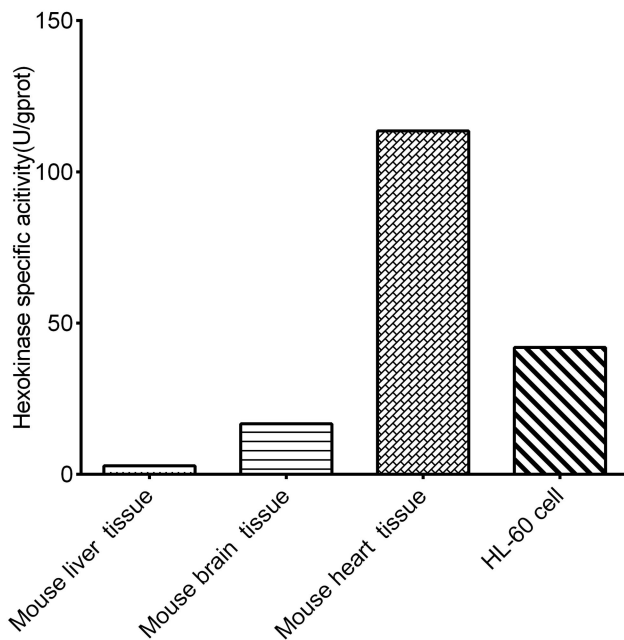
附录2 实例分析

例如检测10%小鼠肝组织(数据仅供参考):

取10%小鼠肝组织匀浆上清10 μL , 按操作表操作, 结果如下: 标准曲线:
 $y = 0.6299x - 0.0204$, 对照孔OD值为0.157, 测定孔OD值为0.298, 10%组织
匀浆蛋白浓度为9.45 gprot/L计算结果如下:

$$\text{HK活力(U/gprot)} = (0.298 - 0.157 + 0.0204) \div 0.6299 \div 10 \times 1000 \div 9.45 = 2.71 \text{ U/gprot}$$

按说明书操作, 测定小鼠肝组织(10%组织匀浆蛋白浓度9.45 gprot/L, 加
样量10 μL)、小鼠脑组织(10%组织匀浆蛋白浓度3.93 gprot/L, 加样量10 μL)、
小鼠心组织(10%组织匀浆蛋白浓度6.45 gprot/L, 稀释5倍, 加样量10 μL)、
HL-60细胞(匀浆蛋白浓度0.79 gprot/L, 加样量为10 μL)中的己糖激酶活力(如
下图):



附录3 问题答疑

问题	可能原因	建议解决方案
样本测不出值	样本稀释倍数太大	选择合适稀释倍数, 重新检测
	样本保存时间过长或者保存不当	取新鲜样本, 重新检测

声明

1. 试剂盒仅供研究使用, 如将其用于临床诊断或任何其他用途, 我公司将不对因此产生的问题负责, 亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器, 严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低, 请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中, 建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责, 不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责, 使用前请充分考虑样本可能的使用量, 预留充足的样本。

