

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

产品货号: E-BC-K768-M

产品规格: 96T(40 samples)

检测仪器: 酶标仪(440-460 nm)

Elabscience®葡萄糖激酶(GCK)比色法测试盒

Glucokinase (GCK) Activity Colorimetric 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及细胞中的葡萄糖激酶(GCK)的活力。

检测原理

葡萄糖激酶(glucokinase, GCK)是糖代谢途径中的关键酶,参与糖酵解第一步反应,催化葡萄糖磷酸化,促进胰岛素分泌和葡萄糖代谢,有效控制体内血糖平衡。GCK 又称己糖激酶 IV 主要在肝细胞和胰岛 β 细胞中表达,与其它己糖激酶相比, GCK 对葡萄糖有更强的亲和力。因此在高糖浓度下,测得的为样本中总己糖激酶活性,低糖浓度下测得的为对葡萄糖低亲和性的己糖激酶活性,总己糖激酶减去己糖激酶即可得到样本中 GCK 的活性。

本试剂盒的检测原理: GCK 催化底物反应产生 NADPH,与显色剂发生反应,于 450 nm 处测定显色物质生成速率可计算出 GCK 的活力。

本试剂盒检测组织和细胞样本时,需测定总蛋白浓度,推荐使用 BCA 法(货号: E-BC-K318-M)。

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)	提取液 A (Extraction Solution A)	50 mL×1 瓶	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	提取液 B (Extraction Solution B)	0.6 mL×1 支	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	缓冲液 (Buffer Solution)	20 mL×1 瓶	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	底物 (Substrate)	1.2 mL×1 支	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂五 (Reagent 5)	酶试剂 (Enzyme Reagent)	粉剂×2 支	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂六 (Reagent 6)	促进剂 (Accelerant)	粉剂×2 支	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂七 (Reagent 7)	显色剂 (Chromogenic Agent)	3.5 mL×1 瓶	-20°C 避光 保存 6 个月

试剂八 (Reagent 8)	标准品 (Standard)	粉剂×2支	-20°C 避光 保存6个月
	96孔酶标板	1板	
	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(440-460 nm，最佳检测波长 450 nm)，37 °C 恒温箱

试剂准备

① 检测前，试剂盒中的试剂平衡至25 °C。

② 提取工作液的配制：

将试剂一：试剂二按体积比 = 99: 1 配制，现配现用，置于冰上避光待用，当天使用有效。

③ 试剂五工作液的配制：

取一支试剂五加入1.5 mL试剂三，混匀溶解，未使用完的试剂可分装-20 °C 下避光保存5天。

④ 试剂六工作液的配制：

取一支试剂六加入1 mL试剂三，混匀溶解，未使用完的试剂可分装-20 °C 下避光保存5天。

⑤ 测定工作液的配制：

将试剂三：试剂四：试剂五工作液：试剂六工作液按体积比= 2： 1： 1： 1 配制，现配现用，置于冰上避光待用，当天使用有效。

⑥ 对照底物的配制：

将试剂三：试剂四按体积比 = 199: 1 配制，现配现用，置于冰上避光待用，当天使用有效。

⑦ 对照工作液的配制：

将试剂三：对照底物：试剂五工作液：试剂六工作液按体积比=2：1：1：1配制，现配现用，置于冰上避光待用，当天使用有效。

⑧ 0.5 mmol/L 标准品的配制：

取一支试剂八加入 1.5 mL 双蒸水溶解，置于冰上待用，未使用完的标准品可分装-20℃下避光保存 2 天。

⑨ 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	0.1	0.2	0.3	0.35	0.4	0.45	0.5
0.5 mmol/L 标准品 (μL)	0	40	80	120	140	160	180	200
双蒸水 (μL)	200	160	120	80	60	40	20	0

样本准备

① 样本处理

组织样本：按照组织样本质量(g)：提取工作液体积(mL)=1:9的比例匀浆(如0.1 g组织样本，加入0.9 mL提取工作液)。4℃，10000 × g，离心10 min，取上清置于冰盒上待测，3 h内使用为宜。

细胞样本：取 1×10^6 个细胞加入200 μL的提取工作液匀浆，4℃，10000 × g，离心10 min，取上清置于冰盒上待测，3 h内使用为宜。

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：2.62-42.80 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%小鼠肝组织	不稀释	10%小鼠肾组织	不稀释
10%小鼠脑组织	不稀释	10%小鼠心组织	不稀释
10%小鼠小肠组织	不稀释	1×10^6 个 Jurkat 细胞	不稀释
1×10^6 个 HL-60 细胞	不稀释	1×10^6 个 293T 细胞	不稀释

注：稀释液为提取工作液。

操作步骤

- ① 标准孔：取 20 μL 不同浓度标准品溶液加入相应的酶标孔中。
测定孔：取 20 μL 待测样本加入相应的酶标孔中。
对照孔：取 20 μL 待测样本加入相应的酶标孔中。
- ② 向步骤①中的标准孔和测定孔中加入 100 μL 测定工作液。
向步骤①中的对照孔中加入 100 μL 对照工作液。
- ③ 向步骤②中的各孔中加入 30 μL 试剂七。
- ④ 振板 5 s，酶标仪 450 nm 波长下检测各孔 OD 值 A_1 ，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 5 min 后检测各孔 OD 值 A_2 。(标准曲线使用 A_2 值绘制)

操作表

	标准孔	测定孔	对照孔
不同浓度标准品(μL)	20	--	--
待测样本(μL)	--	20	20
测定工作液(μL)	100	100	--
对照工作液(μL)	--	--	100
试剂七(μL)	30	30	30
振板 5 s，酶标仪 450 nm 波长下检测各孔 OD 值 A_1 ，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 5 min 后检测各孔 OD 值 A_2 。(标准曲线使用 A_2 值绘制)			

本试剂盒检测组织和细胞样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用 BCA 法（货号：E-BC-K318-M）。

结果计算

标准品拟合曲线： $y = ax + b$

组织和细胞样本中葡萄糖激酶(GCK)活力计算公式：

定义：37℃ 条件下，每克组织或细胞蛋白每分钟催化底物生成 1 μmol NADPH 的所需的酶量为 1 个酶活力单位。

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

注解：

y: 标准品 OD 值-空白 OD 值 (标准品浓度为 0 时的 OD 值), 标准曲线使用 A_2 绘制

x: 标准品的浓度

a: 标准曲线的斜率

b: 标准曲线的截距

ΔA_{450} : $\Delta A_{450} = \Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{对照}}$, $\Delta A = A_2 - A_1$

T: 反应时间, 5 min

1000: 1 mmol/L = 1000 $\mu\text{mol/L}$

f: 样本加入检测体系前的稀释倍数

C_{pr} : 待测样本的蛋白浓度, gprot/L

附录1 关键数据

1. 技术参数

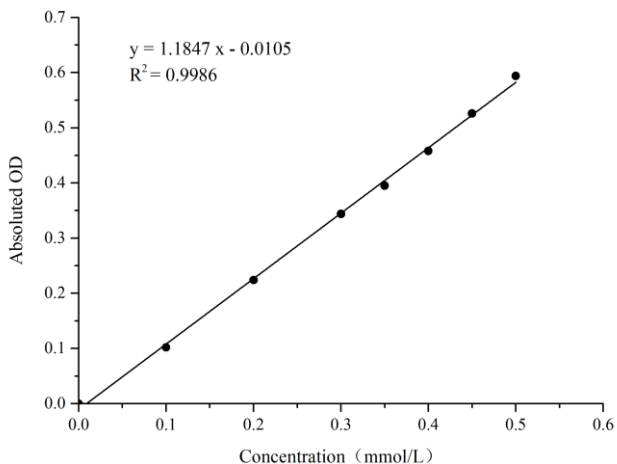
检测范围	2.62-42.80 U/L	批间差	1.3-7.4%
灵敏度	2.62 U/L	批内差	2.9-6.6%
稀释回收率	96-110%		

2. 标准曲线(数据仅供参考)

①不同浓度的标准品加样量为20 μL，按照操作表进行操作记录OD值，结果如下：

标准品浓度 (mmol/L)	0	0.1	0.2	0.3	0.35	0.4	0.45	0.5
OD 值	0.059	0.158	0.278	0.398	0.438	0.510	0.575	0.648
	0.062	0.167	0.291	0.410	0.473	0.526	0.597	0.660
平均 OD 值	0.061	0.163	0.285	0.404	0.456	0.518	0.586	0.654
绝对 OD 值	0	0.102	0.224	0.344	0.395	0.458	0.526	0.594

②绘制标准曲线，如下图所示：



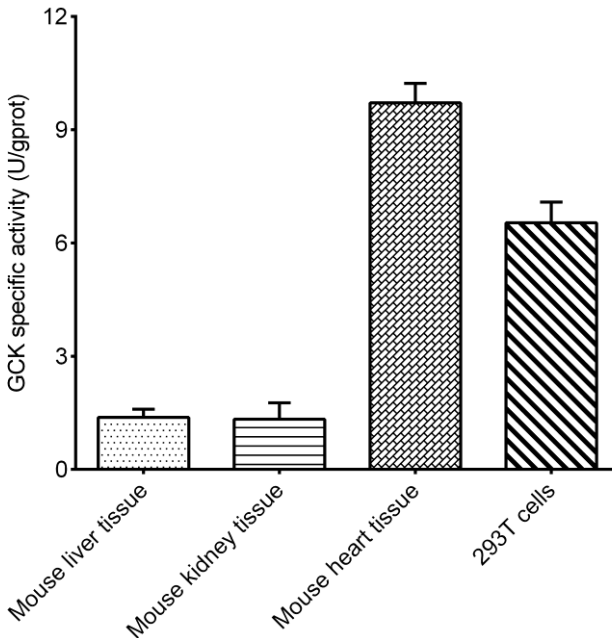
附录 2 实例分析

例如小鼠肝组织(数据仅供参考):

取20 μL 10%小鼠肝组织匀浆上清液加入到酶标板孔中,按操作表操作,结果如下:标准曲线: $y = 1.1847x - 0.0105$,测定孔 A_1 值为0.394, A_2 值为0.887, $\Delta A_{\text{测定}} = 0.887 - 0.394 = 0.493$;对照孔 A_1 值为0.312, A_2 值为0.746, $\Delta A_{\text{对照}} = 0.746 - 0.312 = 0.434$; $\Delta A_{450} = \Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{对照}} = 0.493 - 0.434 = 0.059$ 。测定出10%小鼠肝组织匀浆蛋白含量为8.65 gprot/L,计算结果为:

$$\text{GCK活力} = (0.059 + 0.0105) \div 1.1847 \div 5 \times 1000 \div 8.65 = 1.36 \text{ U/gprot}$$

按说明书操作,测定小鼠肝组织(10%组织匀浆蛋白含量为8.65 gprot/L,加样量20 μL)、小鼠肾组织(10%组织匀浆蛋白含量为8.13 gprot/L,加样量20 μL)、小鼠心组织(10%组织匀浆蛋白含量为8.27 gprot/L,加样量20 μL)、293T细胞 (1×10^6 个细胞蛋白含量为0.484 gprot/L,加样量20 μL)中的GCK活力(如下图):



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。

