己糖激酶(HK)试剂盒

微板法

本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断

使用说明书

货号：JL-T0940　　**有 效 期：**6 个月

规格：48T(20S)/96T(44S)　　**保存温度：**2-8℃和-20℃

实验原理：

己糖激酶是葡萄糖分解的关键酶，在不同的物种中都存在，是催化已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 450nm 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。

本试剂盒检测组织和细胞样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用 BCA 法（货号：JL-T0336）。

检测范围：0.01-0.8mmol/L　　灵敏度：0.01mmol/L

注意事项：

1. 不能使用过期产品，不同货号和批号组分不得混用。
2. 本试剂开封后请尽快使用，以免空气、采样污染引起试剂变质。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 如果可能传播疾病，所有的样品都应管理好，按照规定的程序处理样品和检测装置。
5. 试剂严格按保存条件保存，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。试剂盒中如有提供粉剂，使用前请甩几下，使粉剂落入底部。

产品组成：

试剂名称	规格（48T/20S）	规格（96T/44S）	保存条件
试剂一	15mL×1 瓶	30mL×1 瓶	2-8℃
试剂二	粉剂×1 瓶	粉剂×2 瓶	-20℃，避光
试剂三	粉剂×1 瓶	粉剂×2 瓶	-20℃，避光
试剂四	1mL×1 瓶	1mL×2 瓶	-20℃，避光
标准品	粉剂×1 瓶	粉剂×2 瓶	-20℃，避光

所需仪器耗材及试剂：

离心机、酶标仪、可调式移液器、蒸馏水、0.9% NaCl、水浴锅。

样本处理及要求：

1. **试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围**，建议实验前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定，根据预实验的结果，结合本试剂盒的线性范围：0.01-0.8mmol/L，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，样本的稀释液为 0.9% NaCl。

2. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议做预实验验证其检测有效性

3. **血清（浆）等液体样本**：直接测定。若浑浊，离心后取上清测定。

4. **组织样本：**按照组织质量(g):0.9% NaCl(mL)为 1:5~10 的比例(例如约 0.1g 组织，加入 1mL0.9% NaCl)进行匀浆，匀浆后，4℃，10000 g 离心 10min，取上清置冰上待测。如需检测蛋白浓度，可留取部分上清用于蛋白浓度测定。

5. **细菌/细胞样本：**收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；按照细菌/细胞数量（10^4）：0.9% NaCl（mL）为 500~1000：1 的比例(建议按照每 500 万细菌或细胞加入 1mL0.9% NaCl)，超声波破碎细菌或细胞（功率 200w，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次)，10000 g，离心 10min，取上清待测。

检测前准备工作：

1. 请提前取出试剂盒，平衡至室温。

2. **试剂二工作液的配置：**取一瓶试剂二用 6mL 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°C 避光保存两周。

3. **试剂三工作液的配置：**取一支试剂三用 6mL 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°C 避光保存两周。

4. **标准工作液配置**：取蒸馏水 10mL 加入标准品溶解为 1mmol/L 标准品母液。把标准品母液用蒸馏水稀释成以下浓度梯度的标准品：现配现用，按需配制，1 小时内使用完：0mmol/L、0.05mmol/L、0.1mmol/L、0.15mmol/L、0.2mmol/L、0.3mmol/L、0.4mmol/L、0.5mmol/L。（注：配制目标浓度的标准品工作液时，每次请根据表格从标准品母液中取对应的体积与相应稀释液混合均匀后使用。）

编号	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
标准品浓度 (mmol/L)	0	0.05	0.1	0.15	0.2	0.3	0.4	0.5
1mmol/L 标准品(μL)	0	50	100	150	200	300	400	500
蒸馏水(μL)	1000	950	900	850	800	700	600	500

也可根据实际样本来调整标准品浓度。按照标准管加样体系操作，依据结果即可制作标准曲线；本说明书中的标曲是用蒸馏水稀释得出，若选取其他稀释液可选择重做标曲。

操作步骤：

1. **酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 450nm。**

2. **样本测定（在 96 孔板中依次加入）：**

试剂名称(μL)	标准孔	测定孔	对照孔
不同浓度的标准品	20		
样本		20	20
蒸馏水			200
试剂二	100	100	
试剂三	100	100	
试剂四	10	10	10
37°C 下孵育 10min，酶标仪 450nm 波长下测定各孔 OD 值。			

实验结果结算：

1. **标准品拟合曲线：** y=ax+b

2. **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 1μmol 6-磷酸葡萄糖所需要的酶量为一个酶活单位。

HK 活力(U/gprot)=(△A-b)÷a÷T×1000÷Cpr×N

注：

△A：测定孔 OD 值-对照孔 OD 值

x：标准品的浓度

a：标曲的斜率

b：标曲的截距

N：样本加入检测体系前的稀释倍数

y：标准品 OD 值-空白孔 OD 值(标准品浓度为 0 时的 OD 值)

N：样本稀释倍数

W：样品质量，g

Cpr：待测样本的蛋白浓度，mg/mL

T：37℃孵育时间，10 min

1000：1mmol=1000μmol

参考样本数据：

以下数据仅供参考：

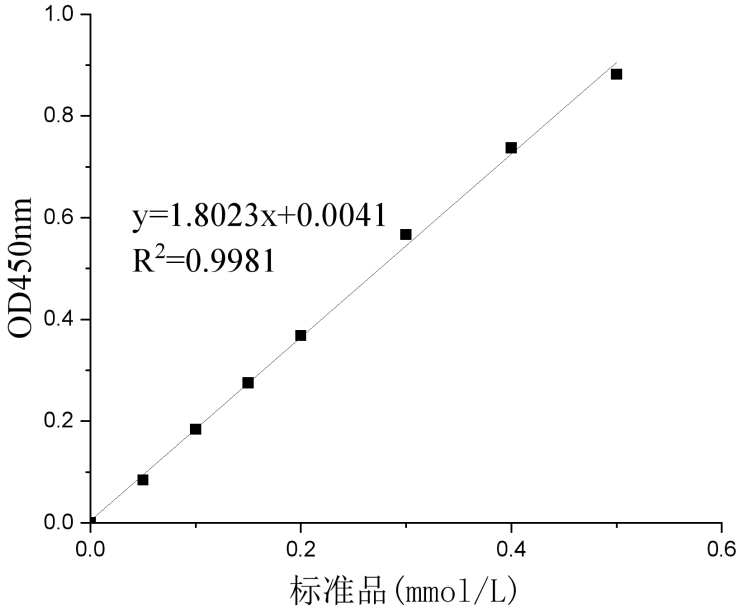
样本类型	稀释倍数	参考值
小鼠肝（10%匀浆）	2 倍稀释	2.498U/g prot
小鼠肾（10%匀浆）	不稀释	2.171U/g prot
小鼠肺（10%匀浆）	不稀释	1.921U/g prot
大鼠肝脏（10%匀浆）	2 倍稀释	3.354U/g prot

NOTE:

NOTE:

参考曲线：

y=1.023x+0004,R^2=0.9981,x 是标准品的浓度（mmol/L），y 是△A。



注意：本图仅供参考，应以每次实验数据所绘制标准曲线计算样本含量。

咨询电话：400-0066-400

传　　真：021-55660885

电子邮箱：shjlsw@163.com

网　　址：www.jonln.com