

葡萄糖激酶(glucokinase, GK)活性测定试剂盒说明书

(货号: BP10258F 紫外法 48 样 有效期: 3 个月)

一、指标介绍:

葡萄糖激酶 (GK, EC 2.7.1.2) 是己糖激酶家族中的一员, 主要存在于成熟的肝细胞和胰岛细胞中。在正常的生理条件下, GK 的主要作用是监控血中葡萄糖水平。

葡萄糖激酶(GK)磷酸化葡萄糖并产生 6-磷酸葡萄糖, 该产物进一步与 6-磷酸葡萄糖脱氢酶和 NADP⁺偶联, 在 340 nm 测 NADPH 光吸收增加量, 进而计算出该酶活性大小。

二、试剂盒的组成和配制:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 60mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	液体 40mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂二	粉剂 1 瓶	-20℃ 保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部 (可手动甩一甩); 2. 加 2.2mL 的蒸馏水溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂三	粉体 1 瓶	4℃ 保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部 (可手动甩一甩); 2. 加入 36mL 的试剂一溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。

三、实验器材:

研钵 (匀浆机)、冰盒 (制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅 (烘箱、培养箱、金属浴)、1ml 石英比色皿、离心管、紫外分光光度计、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本 (例如不同类型或分组) 进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

1、样本提取:

① 组织样本:

称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆。12000rpm, 4℃ 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可以按照组织质量 (g): 提取液体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例提取。

② 细菌/细胞样本:

先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 取 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液; 冰浴超声波破碎细菌或细胞 (冰浴, 功率 20% 或 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次); 12000rpm, 4℃ 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照细菌或细胞数量 (10⁴ 个): 提取液体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例进行提取。

③ 液体样本: 直接检测。若浑浊, 离心后取上清检测。

2、检测步骤:

① 紫外分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 340nm, 蒸馏水调零。

② 配置好的试剂二和三在 25℃ 预热 5min 至室温;

③ 在 1mL 石英比色皿 (光径 1cm) 中依次加入:

试剂 (μL)	测定管
样本	80

试剂二	40
试剂三	680
混匀，1min 时于 340nm 处读取吸光值 A1， 21min（即 20min 后）读取 A2， $\Delta A = A2 - A1$ 。	

- 【注】1. 若 ΔA 的值在零附近，可以适当延长反应时间到 30min 或更长读取 A2，改变后的反应时间需代入计算公式重新计算。或适当加大样本量，则改变后的加样体积 V1 需代入计算公式重新计算。
2. 若上升趋势不稳定，可以每隔 10S 读取一次吸光值，选取一段线性上升的时间段来参与计算，相对应的 A 值也代入计算公式重新计算。

五、结果计算：

1、按样本蛋白浓度计算

单位定义：每毫克组织蛋白每分钟生成 1 nmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

葡萄糖激酶(GK) (nmol/min/mg prot) = $[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (V1 \times Cpr) \div T = 80.4 \times \Delta A \div Cpr$

2、按样本鲜重计算

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

葡萄糖激酶(GK) (nmol/min/g 鲜重) = $[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T = 80.4 \times \Delta A \div W$

3、按细菌或细胞密度计算

单位定义：每 1 万个细菌或细胞每分钟生成 1 nmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

葡萄糖激酶(GK) (nmol/min/10⁴ cell) = $[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.16 \times \Delta A$

4、按液体体积计算

单位定义：每毫升液体在每分钟生成 1 nmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

葡萄糖激酶(GK) (nmol/min/mL) = $[\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V1 \div T = 80.4 \times \Delta A$

ϵ ---NADPH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3 \text{ L} / \text{mol} / \text{cm}$ ； d---1mL 石英比色皿，1cm；
V---加入提取液体积，1 mL； V1---加入样本体积，0.08mL；
V2---反应体系总体积， $8 \times 10^{-4} \text{ L}$ ； T---反应时间，20min；
W---样本质量，g； 500---细菌或细胞总数，500 万；
Cpr---样本蛋白质浓度，mg/mL；建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。