

## 葡萄糖激酶(glucokinase, GK)活性测定试剂盒说明书

### (微板法 96 样)

#### 一、产品简介：

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<sup>+</sup> 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：

| 试剂名称 | 规格           | 保存要求    | 备注                                 |
|------|--------------|---------|------------------------------------|
| 提取液  | 液体 120mL×1 瓶 | 4℃ 保存   |                                    |
| 试剂一  | 液体 20mL×1 瓶  | 4℃ 保存   |                                    |
| 试剂二  | 粉剂 μg×1 支    | -20℃ 保存 | 临用前甩几下或离心使粉剂落入底部，再加 1.1mL 蒸馏水溶解备用。 |
| 试剂三  | 粉剂 mg×1 瓶    | 4℃ 保存   | 临用前甩几下或离心使粉剂落入底部，再加 18mL 试剂一溶解备用。  |

#### 三、所需的仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、恒温水浴锅、台式离心机、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

#### 四、葡萄糖激酶(GK)活性测定：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

##### 1、样本制备：

###### 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（10<sup>4</sup> 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、上机检测：

① 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 340nm。

② 配置好的试剂二和三在 25℃ 预热 5min 至室温；

③ 在 96 孔板中依次加入：

| 试剂（μL）   | 测定管 |
|--|-----|
| 样本   | 20  |
| 试剂二  | 10  |
| 试剂三  | 170 |
| 混匀，1min 时在 340nm 处读取吸光值 A1，21min（即 20min 后）读取 A2，ΔA=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。

$$\text{葡萄糖激酶(GK)(nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (V1 \times Cpr) \div T = 160.77 \times \Delta A \div Cpr$$

### 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。

$$\text{葡萄糖激酶(GK)(nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T = 160.77 \times \Delta A \div W$$

### 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。

$$\text{葡萄糖激酶(GK)(nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.32 \times \Delta A$$

### 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。

$$\text{葡萄糖激酶(GK)(nmol/min/mL)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V1 \div T = 160.77 \times \Delta A$$

$\epsilon$ ---NADPH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3 \text{ L / mol / cm}$ ； d---96 孔板光径，0.5cm；

V---加入提取液体积，1 mL；

V1---加入样本体积，0.02 mL；

V2---反应体系总体积， $2 \times 10^{-4} \text{ L}$ ；

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。