

葡萄糖激酶(glucokinase, GK)活性测定试剂盒说明书

(紫外分光法 48 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⁺ 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 100mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	液体 40mL×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 2.2mL 的蒸馏水溶解备用。
试剂三	粉体 mg×1 瓶	4℃ 保存	临用前甩几下或离心使粉剂落入底部，再加 36mL 的试剂一溶解备用。

三、所需的仪器和用品：

紫外分光光度计、1mL 石英比色皿（光径 1cm）、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（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、上机检测：

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 时在 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/ 10^4 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)=[$\Delta A \times V_{反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9$] $\div V1 \div T = 80.4 \times \Delta A$

ϵ ---NADPH摩尔消光系数， 6.22×10^3 L / mol / 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， 8×10^{-4} 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。