

Glycerol Kinase (GK) Activity kit

甘油激酶（GK）活性测定试剂盒说明书

货号: BN72226 | 方法: 微板法 | 规格: 96 样

一、产品简介:

甘油激酶（GK，EC 2.7.1.30）是甘油代谢中的限速酶，催化甘油磷酸化产生 3-磷酸甘油，3-磷酸甘油在 3-磷酸甘油脱氢酶的作用下产生磷酸二羟丙酮，进入糖酵解途径氧化分解释放能量。该酶的缺乏将直接导致细胞不能利用甘油。

本试剂盒采用甘油激酶催化 Mg-ATP 依赖的甘油磷酸化为 3-磷酸甘油，3-磷酸甘油在磷酸甘油氧化酶的作用下产生过氧化氢，过氧化氢与显色剂反应在 510nm 处有最大吸收峰。通过测定 510nm 处的增加速率即可得出甘油激酶的酶活力大小。

二、试剂盒组成和配制:

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	粉剂 mg×1 支	-20℃保存	用前甩几下或离心使粉剂落入底部，临用前加 1.1mL 蒸馏水溶解备用。用不完的试剂 4℃保存。
试剂二	粉剂 mg×1 支	-20℃保存	用前甩几下或离心使粉剂落入底部，临用前加 1.1mL 蒸馏水溶解备用。用不完的试剂 4℃保存。
试剂三	液体 6mL×1 瓶	4℃保存	
试剂四	液体 9mL×1 瓶	4℃保存	
试剂五	液体 μL×1 支	4℃保存	用前甩几下或离心使试剂落入底部，临用前加 2.2mL 蒸馏水溶解备用。用不完的试剂 4℃保存。
标准品	液体 1 mL×1 支	4℃保存	若重新做标曲，则用到该试剂

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、可调试移液器、台式离心机、水浴锅、研钵、冰和蒸馏水。

四、甘油激酶（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：取约 0.1g 组织（水分充足的样本可取 0.5g）到研钵内，加入 1mL 提取液，在冰上进行冰浴匀浆或者液氮研磨。12000rpm，4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

【注】：也可以按照组织质量（g）：提取液体积(mL)为 1：5~10 的比例提取）

- ② 细菌/真菌样本：先收集细菌/真菌到离心管内，离心后弃上清；取 500 万细菌/真菌加入 1mL 提取液；冰浴超声波破碎细菌/真菌（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】：也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：澄清的液体样本直接检测，若浑浊则离心后取上清液检测。

2、上机检测：

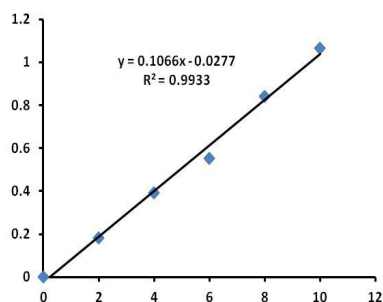
- ① 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 510nm。
- ② 在 96 孔板中依次加入下列试剂：

试剂名称 (μL)	测定管
样本	10
试剂一	10
试剂二	10
试剂三	60
试剂四	90
混匀，37℃避光静止 5min。	
试剂五	20
混匀，37℃下，立即于 510nm 读取吸光值 A1，避光孵育 5min 后读取 A2。ΔA=A2-A1。	

注意：本操作流程适用于绝大多数常规样本检测，实验条件可根据实际样本状态适度微调；针对特殊类型样本，我司技术支持可提供专属优化建议。

五、结果计算：

1、标准曲线：y = 0.1066x - 0.0277：x 为 H₂O₂ 标准品浓度(μmol/mL)，y 为 ΔA。



标准曲线示意图

说明：标准曲线由标准品测定获得，具体制作方法详见随货说明书或咨询技术支持。

2、按样本鲜重计算：

酶活定义：每克组织每分钟催化生成 1μmolH₂O₂ 定义为一个酶活单位 (U)。

$$GK(\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0277) \div 0.1066 \times V1] \div (W \times V1 \div V) \div T = 1.88 \times (\Delta A + 0.0277) \div W$$

3、按样本蛋白浓度计算：

酶活定义：每毫克组织蛋白每分钟催化生成 1μmolH₂O₂ 定义为一个酶活单位 (U)。

$$GK(\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [(\Delta A + 0.0277) \div 0.1066 \times V1] \div (V1 \times Cpr) \div T = 1.88 \times (\Delta A + 0.0277) \div Cpr$$

4、按细胞数量计算：

酶活定义：每 10⁴ 个细胞每分钟催化生成 1μmolH₂O₂ 定义为一个酶活单位 (U)。

$$GK(\mu\text{mol}/\text{min}/10^4\text{cell}) = [(\Delta A + 0.0277) \div 0.1066 \times V1] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.004 \times (\Delta A + 0.0277)$$

5、按液体体积计算：

酶活定义：每毫升液体每分钟催化生成 1μmolH₂O₂ 定义为一个酶活单位 (U)。

$$GK(\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}) = [(\Delta A + 0.0277) \div 0.1066 \times V1] \div V1 \div T = 1.88 \times (\Delta A + 0.0277)$$

V---加入提取液体积，1 mL；

V1---加入样本体积，0.01mL；

T---反应时间，5 min；

W---样本质量； 500---细胞数量；

Cpr---样本蛋白质浓度，mg/mL；建议使用本公司的蛋白含量测定试剂盒。

本产品仅用于科研

TEL: 010-82422342 www.biorigin.Ltd