

葡萄糖-6-磷酸 (G6P) 含量试剂盒说明书

(货号: G0825W48 微板法 48 样)

一、产品简介:

葡萄糖-6-磷酸 (G6P) 是在碳六上磷酸化的葡萄糖。大多数进入细胞的葡萄糖被磷酸化为 G6P, 除了参与糖酵解和磷酸戊糖代谢途径, 葡萄糖 6-磷酸还可以转化为糖原或淀粉。

本试剂盒提供一种简单, 灵敏, 快速的测定方法: 葡萄糖-6-磷酸 (G6P) 被特异的酶作用, 过程中产生的 NADH 与一种灵敏显色探针结合, 在 450nm 处有最大吸收波长。其生成的有色物质颜色强度与样品中的 G6P 浓度成比例。

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 60mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉体 mg×1 支	4℃保存	用前甩几下或离心使试剂落入底部, 再加 0.65mL 蒸馏水溶解备用。
试剂二	液体 0.6mL×1 支	4℃保存	
试剂三	粉体 mg×1 支	-20℃保存	用前甩几下或离心使试剂落入底部, 再加 0.65mL 蒸馏水溶解备用, 可 -20℃分装冻存, 尽量避免反复冻融。
试剂四	液体 10mL×1 瓶	4℃保存	
标准品	液体 1.5mL×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、台式离心机、可调式移液器、研钵、冰、水浴锅/恒温培养箱和蒸馏水。

四、葡萄糖-6-磷酸 (G6P) 含量测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品和实验流程, 避免样本和试剂浪费!

1、样本制备

① 组织样本:

建议称取约 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; 取约 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液, 超声波破碎细菌或细胞 (冰浴, 功率 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/细胞数量 (10^4): 提取液 (mL) 为 500~1000: 1 的比例进行提取。

③ 液体样本: 直接检测。

2、上机检测:

① 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 450nm。

② 试剂解冻至室温 (25℃); 或于水浴锅 (25℃) 中孵育 5-15min

③ 在 96 孔板中按照下表依次加入试剂:

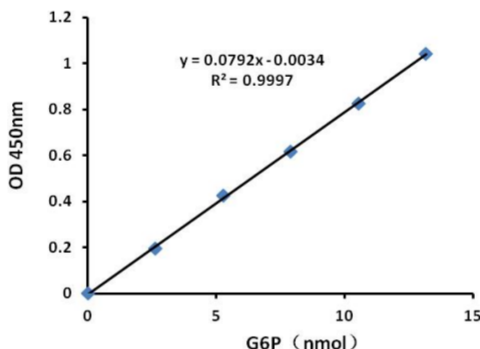
试剂名称 (μL)	测定管	空白对照(仅做一个)
样本	20	0
试剂一	10	10
试剂二	10	10
试剂三	10	10
试剂四	150	170
混匀, 于室温 (25°C) 条件下反应 20min, 于 450nm 处读取吸光值 A, $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$ 。		

【注】1. 若样本自身有很强的背景值 (如较高含量还原性物质: NAD(P)H 或 VC 等), 可以加设一个样本自身对照: 即试剂三用蒸馏水替代, 其他试剂保持不变, 则 $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ 。

2. 若 ΔA 小于 0.01, 可增加样本量 V1 (如增至 100μL, 则试剂四相应减少, 保持总体积不变), 或增加样本取样质量 W, 则改变后的 V1 和 W 需代入公式重新计算。

五、结果计算:

1、标准曲线方程: $y = 0.0792x - 0.0034$; x 是标准品质量: nmol, y 是 ΔA 。



2、按样本重量计算:

$$\text{G6P 含量}(\mu\text{g/g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0034) \div 0.0792 \times \text{Mr}] \div (W \times V1 \div V) \times 10^{-3} = 164.2 \times (\Delta A + 0.0034) \div W$$

3、按细胞数量计算:

$$\text{G6P 含量}(\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0034) \div 0.0792 \times \text{Mr}] \div (500 \times V1 \div V) \times 10^{-3} = 0.33 \times (\Delta A + 0.0034) \times D$$

4、按照液体体积计算:

$$\text{G6P 含量}(\mu\text{g/mL}) = [(\Delta A + 0.0034) \div 0.0792 \times \text{Mr}] \div V1 \times 10^{-3} = 164.2 \times (\Delta A + 0.0034)$$

V---加入提取液体积, 1 mL;

V1---加入样本体积, 0.02mL;

Mr---葡萄糖-6-磷酸 (G6P) 分子量: 260.1;

W---样本质量, g。

附: 标准曲线制作过程:

1 制备标准品母液 (4μmol/mL):

2 把母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品: 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 μmol/mL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。

3 依据测定管的加样表操作, 根据结果即可制作标准曲线。