

果糖-6-磷酸（F6P）含量试剂盒说明书

（货号:G0878W48 微板法 48 样）

一、产品简介：

果糖-6-磷酸(F6P)是糖代谢和糖异生途径的中间产物，广泛地存在于动植物和微生物体中。

本试剂盒提供一种简单，灵敏，快速的测定方法：果糖-6-磷酸（F6P）在磷酸葡萄糖异构酶和磷酸葡萄糖脱氢酶的相继作用下使 NADP^+ 还原成 NADPH，通过检测 NADPH 在 340nm 处的增加量即可计算得出样品中的 F6P 含量。

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	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。用不完的液体试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融。
试剂三	液体 9mL×1 瓶	4℃保存	
试剂四	液体 μL ×1 支	-20℃保存	用前甩几下或离心使试剂落入底部，再加 0.6mL 蒸馏水溶解备用。用不完的液体试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融。
标准品	粉体 mg×1 支	4℃保存	仅用来鉴定试剂盒中试剂是否正常（不参与结果计算）。 使用方法：用前标准管（F6P）甩几下使粉剂落入底部，再加 0.5mL 蒸馏水混匀溶解即浓度为 $20\mu\text{mol/mL}$ ，再稀释 20 倍成 $1\mu\text{mol/mL}$ 的 F6P 后备用；按照加样表中测定管操作（样本更换成备用浓度标准品）。

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、水浴锅、冰和蒸馏水。

四、果糖-6-磷酸（F6P）含量测定：

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 340nm。
- ② 试剂解冻至室温（25℃），或可放在 25℃条件下水浴 5-15min。
- ③ 试剂一和二和三可按照 10:10:150 比例配成混合液（一枪加 170μL 该混合液）（该混合液用多少配多少，现配现用）。
- ④ 在 96 孔板中按照下表依次加入试剂：

试剂名称（μL）	测定管	空白管（仅做一次）
试剂一	10	10
试剂二	10	10
试剂三	150	170
样本	20	
混匀，于室温（25℃）下孵育 20min 后于 340nm 处读取 A1（若 A 值继续增加，需延长孵育时间，直至 2 分钟内吸光值不变）。		
试剂四	10	10
混匀，于室温（25℃）下孵育 20min 后于 340nm 处读取 A2（若 A 值继续增加，需延长孵育时间，直至 2 分钟内吸光值不变）， $\Delta A = (A2 - A1)$ 测定 - $(A2 - A1)$ 空白。		

【注】若 ΔA 的差值在零附近徘徊，可增加样本量 V_1 （如增至 100μL，则试剂三相应减少，保持总体积不变），或增加样本取样质量 W ，则改变后的 V_1 和 W 需代入公式重新计算。

五、结果计算：

1、按样本重量计算：

$$\text{F6P 含量}(\mu\text{g/g 鲜重}) = [(\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times 10^6 \times \text{Mr}) \div (W \times V_1 \div V) \times D] = 836 \times \Delta A \div W \times D$$

2、按细胞数量计算：

$$\text{F6P 含量}(\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times 10^6 \times \text{Mr}) \div (500 \times V_1 \div V) \times D] = 1.7 \times \Delta A \times D$$

3、按照液体体积计算：

$$\text{F6P 含量}(\mu\text{g/mL}) = [(\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times 10^6 \times \text{Mr}) \div V_1] = 836 \times \Delta A$$

ϵ ---NADH 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；

V_1 ---加入样本体积，0.02mL；

V_2 ---反应总体积；0.2mL= $2 \times 10^{-4} \text{ L}$ ；

W ---样本质量，g；

Mr ---果糖-6-磷酸（F6P）分子量；260；

500---细胞数量，万；

D ---稀释倍数，未稀释即为 1。