

葡萄糖-6-磷酸 (G6P) 含量试剂盒说明书

(货号:G08105F 紫外法 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) 在磷酸葡萄糖脱氢酶作用下使 NADP⁺还原成 NADPH, 通过检测 NADPH 在 340nm 处的增加量即可计算出样品中的 G6P 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 60mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	粉体 mg×1 支	4°C保存	使用前甩几下或离心使试剂落入底部, 再加 1.8mL 蒸馏水溶解备用。
试剂二	液体 30mL×1 瓶	4°C保存	
试剂三	粉体 mg×1 支	-20°C保存	使用前甩几下或离心使试剂落入底部, 再加 1.8mL 蒸馏水溶解备用。用不完的液体试剂分装后-20°C保存, 禁止反复冻融。
标准品	粉体 mg×1 支	4°C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 (G6P) 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 40μmol/mL, 再稀释 80 倍成 0.5μmol/mL 的 G6P 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:

紫外分光光度计、1mL 石英比色皿 (光径 1cm)、台式离心机、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

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°C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°C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 (10⁴): 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 紫外分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 340nm, 蒸馏水调零。

② 试剂解冻至室温 (25°C), 或可放在 25°C 条件下水浴 5-15min。

- ③ 试剂一和二可按照 30:560 比例配成混合液（一枪加 590 μ L 该混合液）（该混合液用多少配多少，现配现用）。
- ④ 在 1mL 石英比色皿（光径 1cm）中按照下表依次加入试剂：

试剂名称（ μ L）	测定管
样本	80
试剂一	30
试剂二	560
混匀，室温（25 $^{\circ}$ C）下，孵育 10min 后，于 340nm 读取 A1	
试剂三	30
混匀，室温（25 $^{\circ}$ C）下，孵育 20min 后于 340nm 处读取 A2（直到 2min 内 A2 值变化小于 0.02）， $\Delta A=A2-A1$ 。	

五、结果计算：

- 1、按样本重量计算：

$$\text{G6P 含量}(\mu\text{g/g 鲜重})=[(\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^6 \times Mr)] \div (W \times V1 \div V) \times D = 365.8 \times \Delta A \div W \times D$$

- 2、按细胞数量计算：

$$\text{G6P 含量}(\mu\text{g}/10^4 \text{ cell})=[(\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^6 \times Mr)] \div (500 \times V1 \div V) \times D = 0.74 \times \Delta A \times D$$

- 3、按照液体体积计算：

$$\text{G6P 含量}(\mu\text{g/mL})=[(\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^6 \times Mr)] \div V1 = 365.8 \times \Delta A$$

ϵ ---NADPH 摩尔消光系数，6.22 $\times 10^3$ L/mol/cm；

d---光径，1cm；

V---加入提取液体积，1 mL；

V1---加入样本体积，0.08mL；

V2---反应总体积；0.7mL=7 $\times 10^{-4}$ L；

W---样本质量，g；

Mr---葡萄糖-6-磷酸（G6P）分子量；260；

500---细胞数量，万；

D---稀释倍数，未稀释即为 1。