

葡萄糖-6-磷酸 (G6P) 含量试剂盒说明书

(货号:G08105W 微板法 96 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 100mL×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 1.2mL 蒸馏水溶解备用。
试剂二	液体 16mL×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 1.2mL 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 40 倍成 1μmol/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:

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、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 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 340nm。

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

③ 试剂一和二可按照 10:150 比例配成混合液 (一枪加 160μL 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
样本	20
试剂一	10
试剂二	150
混匀，室温 (25°C) 下，孵育 10min 后，于 340nm 读取 A1	
试剂三	10
混匀，室温 (25°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：

$$\text{G6P 含量}(\mu\text{g/g 鲜重}) = [(\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^6 \times Mr) \div (W \times V1 \div V) \times D] = 836 \times \Delta A \div W \times D$$

2、按细胞数量计算：

$$\text{G6P 含量}(\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^6 \times Mr) \div (500 \times V1 \div V) \times D] = 1.7 \times \Delta A \times D$$

3、按照液体体积计算：

$$\text{G6P 含量}(\mu\text{g/mL}) = [(\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^6 \times Mr) \div V1] = 836 \times \Delta A$$

ϵ ---NADPH 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；

$V1$ ---加入样本体积，0.02mL；

$V2$ ---反应总体积；0.2mL= 2×10^{-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。