

葡萄糖-6-磷酸 (G6P) 含量试剂盒说明书

(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) 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 110mL×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 1mL×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。 |
| 试剂四 | 液体 16mL×1 瓶 | 4°C保存 | |
| 标准品 | 液体 1mL×1 支 | 4°C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、冰和蒸馏水。

四、葡萄糖-6-磷酸 (G6P) 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°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 (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°C);

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 |

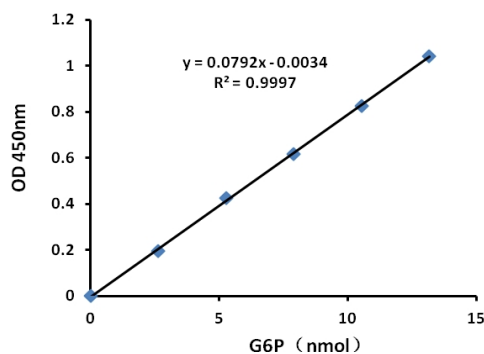
| | | |
|--|-----|-----|
| 试剂四 | 150 | 170 |
| 混匀，于室温（25℃）条件下反应 20min，于 450nm 处读取吸光值 A， $\Delta A=A$ 测定-A 空白。 | | |

【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 $\Delta A=A$ 测定-A 对照。

2. 若 ΔA 的差值在零附近徘徊，可增加样本量 V1（如增至 100 μ L，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：

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

3、按细胞数量计算：

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

4、按照液体体积计算：

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

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（1 μ mol/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. μ mol/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。