

葡萄糖 (Glucose) 含量 (己糖激酶法) 检测试剂盒说明书

(货号: ADS-F-TDX040 分光法 48 样)

一、产品简介:

葡萄糖 (C₆H₁₂O₆), 是产生能量分子ATP的主要来源。本试剂盒提供一种定量、快速、简单、灵敏的检测方法, 葡萄糖在己糖激酶等酶复合物作用下, 使NADPH的量不断增加, 通过检测340nm下该物质的增加量, 进而计算得到葡萄糖含量。

二、试剂盒组分与配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
试剂一	粉剂 1 支	-20°C保存	临用前甩几下或离心, 使粉剂落入底部, 再加 1.4mL 蒸馏水备用
试剂二	35mL 液体×1 瓶	4°C保存	
试剂三	粉剂 1 支	-20°C保存	临用前甩几下或离心, 使粉剂落入底部, 再加 1.4mL 蒸馏水备用

三、所需仪器和用品:

紫外分光光度计、1mL 石英比色皿 (光径 1cm)、天平、移液器、研钵、离心机、蒸馏水。

四、葡萄糖含量检测:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

1、样本制备:

- ① 组织样本: 0.1g 组织样本 (水分充足的样本建议取 0.2g 左右), 加 1mL 的蒸馏水研磨, 粗提液全部转移到 EP 管中, 12000rpm, 常温离心 10min, 上清液待测。注: 若组织样本蛋白含量很高, 可先进行脱蛋白处理。

【注】: 做实验前可以选取几个样本, 找出适合本次检测样本的稀释倍数 D, 果实样本含糖量较高, 可稀释 20-40 倍; 叶片样本可稀释 2-5 倍。

- ② 细胞/菌类样本: 先收集细胞或细菌到离心管内, 离心弃上清; 取 500 万细菌或细胞加入 1mL 蒸馏水; 冰浴超声波破碎细菌或细胞 (冰浴, 功率 20% 或 200W, 超声 3S, 间隔 10S, 重复 30 次); 12000rpm, 常温离心 10min, 取上清液待测。

【注】: 也可按照细菌或细胞数量 (10⁴ 个): 提取液体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例进行提取。

- ③ 液体样品: 近似中性的澄清液体样本可直接检测; 若为酸性样本则需先用 NaOH(2M) 调 PH 值约 7.4, 然后室温静置 30min, 取澄清液体直接检测。

【注】可选取几个样本, 进行不同倍数的稀释, 选取适合本次样本的稀释倍数 D。

2、上机检测:

- ① 紫外分光光度计预热 30min, 设置温度在 25°C, 设定波长到 340nm, 蒸馏水调零。
- ② 在 1mL 石英比色皿中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管	空白管 (仅做一次)
样本	25	
试剂一	25	25
试剂二	625	625
混匀, 5min后于340nm处读取各管的A1值		
试剂三	25	25
混匀, 反应20min于340nm处读取各管的A2值 (若A值继续增加, 需延长反应时间, 直至2分钟内的吸光		

值保持不变), $\Delta A = (A_2 - A_1)_{\text{测定}} - (A_2 - A_1)_{\text{空白}}$ 。

【注】1. 检测反应20min后是否反应完全, 在准备读值时可改用时间扫描3min, 间隔1min, 依此判读反应是否完全。然后再读取各测定管的A值。

2. 若A2大于1.5, 可以适当减少样本量(如10 μ L, 则试剂二相应增加),

3. 若 ΔA 的差值较小, 可增加样本量: 如50 μ L, 则试剂二相应减少。

五、结果计算:

1、按照质量计算:

$$\text{葡萄糖含量(mg/g 鲜重)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times Mr \times 10^3] \div (W \times V_1 \div V) \times D = 0.8 \times \Delta A \div W \times D$$

2、按照细胞数量计算:

$$\text{葡萄糖含量}(\mu\text{g}/10^4\text{cell}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times Mr \times 10^6] \div (500 \times V_1 \div V) \times D = 800.7 \times \Delta A \div 500 \times D$$

3、按照体积计算:

$$\text{葡萄糖含量(mg/mL)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times Mr \times 10^3] \div V_1 \times D = 0.8 \times \Delta A \times D$$

ϵ --- NADPH 的摩尔消光系数, 6.3×10^3 L/mol/cm;

d --- 光径, 1cm;

V --- 加入提取液体积, 1mL;

V1 --- 加入样本体积, 0.025mL; V2 --- 反应

总体积, 7×10^{-4} L;

Mr --- 葡萄糖分子量, 180.16;

W --- 样本鲜重, g;

500-细胞数量, 万;

D --- 稀释倍数, 未稀释即为 1。