

葡萄糖 (Glucose) 含量 (己糖激酶法) 检测试剂盒说明书

(货号: ADS-W-TDX040 微板法 96 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 1.1mL 蒸馏水备用
试剂二	25mL 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 1.1mL 蒸馏水备用

三、所需仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、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 酶标仪预热 30min, 设置温度在 25°C, 设定波长到 340nm。

② 在 96 孔板中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管	空白管 (仅做一次)
样本	10	
试剂一	10	10
试剂二	160	170
混匀, 5min后于340nm处读取各管的A1值		
试剂三	10	10
混匀, 反应20min后于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值超过1.5,可以减少样本加样量:如5 μ L,则试剂二相应增加;或对样本进行稀释,稀释倍数D代入计算公式计算。
3.若 ΔA 的差值较小,可增加样本量:如30 μ L,则试剂二相应减少。

五、结果计算:

1、按照质量计算:

$$\text{葡萄糖含量(mg/g 鲜重)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times Mr \times 10^3] \div (W \times V_1 \div V) \times D = 1.1439 \times \Delta A \div W \times D$$

2、按照细胞数量计算:

$$\text{葡萄糖含量}(\mu\text{g}/10^4\text{cell}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times Mr \times 10^6] \div (500 \times V_1 \div V) \times D = 1143.9 \times \Delta A \div 500 \times D$$

3、按照体积计算:

$$\text{葡萄糖含量(mg/mL)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times Mr \times 10^3] \div V_1 \times D = 1.1439 \times \Delta A \times D$$

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

d---0.5cm;

V---加入提取液体积, 1mL;

V1---加入样本体积, 0.01mL;

V2---反应总体积, 2×10^{-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。