

葡萄糖-6-磷酸 (G6P) 含量试剂盒说明书

(货号: ADS-F-TYS002-50 分光法 48 样 有效期: 3 个月)

一、指标介绍:

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:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 60mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	粉体 1 支	4°C保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部 (可手动甩一甩); 2. 加入 2mL 蒸馏水溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂二	液体 1.5mL×1 支	4°C避光保存	
试剂三	粉体 1 支	-20°C保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部 (可手动甩一甩); 2. 加入 2mL 蒸馏水溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂四	液体 30mL×1 瓶	4°C保存	
标准品	液体 1mL×1 支	4°C保存	1. 若重新做标曲, 则用到该试剂; 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制; 3. 溶解后的标品一周内用完。

三、实验器材:

研钵 (匀浆机)、冰盒 (制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅 (烘箱、培养箱、金属浴)、1ml 比色皿、离心管、分光光度计、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

1、样本提取

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、检测步骤:

① 可见分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 450nm, 蒸馏水调零。

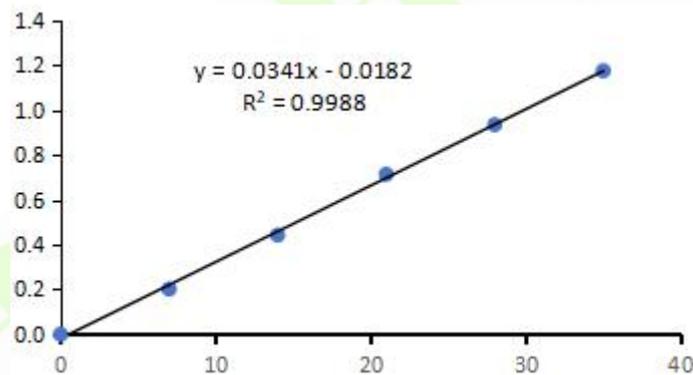
- ② 试剂解冻至室温 (25°C) ;
 ③ 在 EP 管或 1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm) 中按照下表依次加入试剂:

试剂组分 (μL)	测定管	空白对照(仅做一个)
样本	70	0
试剂一	35	35
试剂二	30	30
试剂三	35	35
试剂四	530	600
混匀, 于室温 (25°C) 条件下反应 20min, 于 450nm 处读取吸光值 A, $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$ 。		

- 【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 $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ 。
 2. 若 ΔA 的差值在零附近徘徊, 可增加样本量 V1 (如增至 100μL, 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: $y = 0.0341x - 0.0182$; x 是标准品浓度: nmol, y 是 ΔA 。



- 2、按样本重量计算:

$$\text{G6P 含量}(\mu\text{g/g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0182) \div 0.0341 \times \text{Mr}] \div (W \times V1 \div V) \times 10^{-3} = 109 \times (\Delta A + 0.0182) \div W$$

- 3、按样本蛋白浓度计算:

$$\text{G6P 含量}(\mu\text{g/mg prot}) = [(\Delta A + 0.0182) \div 0.0341 \times \text{Mr}] \div (\text{Cpr} \times V1 \div V) \times 10^{-3} = 109 \times (\Delta A + 0.0182) \div \text{Cpr}$$

- 4、按细胞数量计算:

$$\text{G6P 含量}(\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0182) \div 0.0341 \times \text{Mr}] \div (500 \times V1 \div V) \times 10^{-3} = 0.218 \times (\Delta A + 0.0182) \times D$$

- 5、按照液体体积计算:

$$\text{G6P 含量}(\mu\text{g/mL}) = [(\Delta A + 0.0182) \div 0.0076 \times V1] \div V1 \times 10^{-3} = 109 \times (\Delta A + 0.0182)$$

V---加入提取液体积, 1 mL;

V1---加入样本体积, 0.07mL;

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 标准品母液浓度为 1μmol/mL。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品, 例如: 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 μmol/mL。也可根据实际样本调整标准品浓度。

2 标品稀释参照表如下:

吸取标准品母液 500uL, 加入 500uL 蒸馏水, 混匀得到 0.5 μ mol/mL 的标品稀释液待用。

标品浓度 μ mol/mL	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
标品稀释液 uL	0	40	80	120	160	200
水 uL	200	160	120	80	40	0

各标准管混匀待用。

3 依据测定管加样表操作, 根据结果, 以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值, 过 0 点制作标准曲线。

试剂名称 (μ L)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	70	
蒸馏水		70
试剂一	35	35
试剂二	30	30
试剂三	35	35
试剂四	530	530

混匀, 于室温 (25 $^{\circ}$ C) 条件下反应 20min, 于 450nm 处读取吸光值 A, $\Delta A = A - A_{0}$ 测定-0 浓度管。