果糖-6-磷酸（F6P）含量试剂盒说明书

（货号:ADS-W-T018　微板法 96 样 有效期：3 个月）

一、指标介绍：

果糖-6-磷酸(F6P)是糖代谢和糖异生途径的中间产物 ，广泛地存在于动植物和微生物体中。

本试剂盒提供一种简单，灵敏，快速的测定方法：果糖-6-磷酸（F6P）在磷酸葡萄糖异构酶和磷酸葡萄糖脱氢酶的相继作用下使 $NADP^+$还原成 NADPH，通过检测 NADPH 在 340nm 处的增加量即可计算得出样品中的 F6P 含量。

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 100mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉体 1 支	4℃保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部（可手动甩一甩）； 2. 加入 1.2mL 蒸馏水溶解备用； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂二	粉体 1 支	-20℃保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部（可手动甩一甩）； 2. 加入 1.2mL 蒸馏水溶解备用； 3. 用不完的液体试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融。
试剂三	液体 16mL×1 瓶	4℃保存	
试剂四	液体 1 支	-20℃保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2mim 使试剂落入管底（可手动甩一甩）； 2. 加入 1.1mL 蒸馏水溶解备用； 3. 用不完的液体试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融。
标准品	粉体 1 支	4℃保存	1. 仅用来鉴定试剂盒中试剂是否正常（不参与结果计算）； 2. 使用方法：用前标准管（F6P）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 20 μ mol/mL,再稀释 20 倍成 1 μ mol/mL 的 F6P 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）； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。

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）、96 孔板、离心管、酶标仪、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℃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℃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 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 340nm。

② 试剂解冻至室温（25℃），或可放在 25℃条件下水浴 5-15min。

③ 试剂一和二和三可按照 10:10:150 比例配成混合液（一枪加 170μL 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：

试剂组分（μL）	测定管	空白管（仅做一次）
试剂一	10	10
试剂二	10	10
试剂三	150	170
样本	20	
混匀，于室温（25℃）下孵育 20min 后于 340nm 处读取 A1（若 A 值继续增加，需延长孵育时间，直至 2 分钟内吸光值不变）。		
试剂四	10	10
混匀，于室温（25℃）下孵育 20min 后于 340nm 处读取 A2（若 A 值继续增加，需延长孵育时间，直至 2 分钟内吸光值不变），△A=（A2-A1）测定-（A2-A1）空白。		

【注】若△A 的差值在零附近徘徊，可增加样本量 V1（如增至 100μL，则试剂三相应减少，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、按样本重量计算：

F6P 含量(μg/g 鲜重)=[(ΔA÷(ε×d)×V2×10^6×Mr]÷(W×V1÷V)×D=836×ΔA÷W×D

2、按细胞数量计算：

F6P 含量(μg/10^4 cell)=[(ΔA÷(ε×d)×V2×10^6×Mr]÷(500×V1÷V)×D=1.7×ΔA×D

3、按照液体体积计算：

F6P 含量(μg/mL)=[(ΔA÷(ε×d)×V2×10^6×Mr]÷V1=836×ΔA

4、按蛋白浓度计算：

F6P 含量(μg/mg prot)=[(ΔA÷(ε×d)×V2×10^6×Mr]÷(Cpr×V1÷V)×D=836×ΔA÷Cpr×D

ε---NADH 摩尔消光系数，6.22×10^3 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---果糖-6-磷酸（F6P）分子量；260；　　500---细胞数量，万；

D---稀释倍数，未稀释即为 1；

Cpr---蛋白浓度（mg/mL）；建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。