

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)

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 60mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	粉体 1 支	4°C保存	用前甩几下或离心使试剂落入底部, 再加 2mL 蒸馏水溶解备用。
试剂二	液体 1.5mL×1 瓶	4°C保存	
试剂三	粉体 1 支	-20°C保存	用前甩几下或离心使试剂落入底部, 再加 2mL 蒸馏水溶解备用。
试剂四	液体 30mL×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:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm)、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 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:

试剂名称 (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

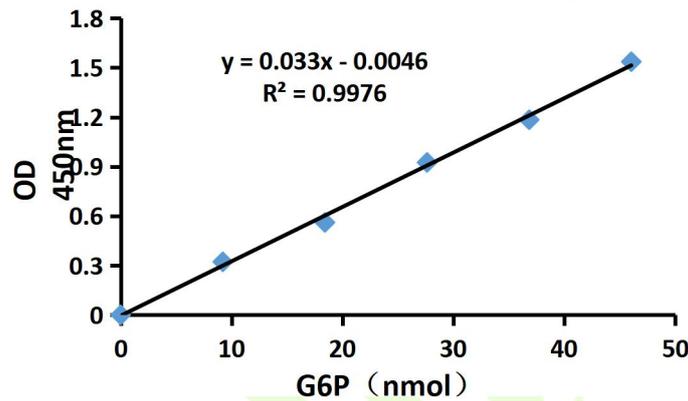
试剂四	530	600
混匀, 于室温 (25°C) 条件下反应 20min, 于 450nm 处读取吸光值 A, $\Delta A=A$ 测定-A 空白。		

【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： $y = 0.033x - 0.0046$ ；x 是标准品浓度：nmol，y 是 ΔA 。



2、按样本重量计算：

$$\text{G6P 含量}(\mu\text{g/g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0046) \div 0.033 \times \text{Mr}] \div (W \times V1 \div V) \times 10^{-3} = 112.6 \times (\Delta A + 0.0046) \div W$$

3、按细胞数量计算：

$$\text{G6P 含量}(\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0046) \div 0.033 \times \text{Mr}] \div (500 \times V1 \div V) \times 10^{-3} = 0.23 \times (\Delta A + 0.0046) \times D$$

4、按照液体体积计算：

$$\text{G6P 含量}(\mu\text{g/mL}) = [(\Delta A + 0.0046) \div 0.0076 \times V1] \div V1 \times 10^{-3} = 112.6 \times (\Delta A + 0.0046)$$

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 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。