

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 有效期：3 个月）

一、指标介绍：

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：

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
试剂一	粉剂 1 支	-20℃保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底（可手动甩一甩）； 2. 加入 1.1mL 蒸馏水备用； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂二	25mL 液体×1 瓶	4℃保存	
试剂三	粉剂 1 支	-20℃保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底（可手动甩一甩）； 2. 使粉剂落入底部，再加 1.1mL 蒸馏水备用； 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、葡萄糖含量检测：

建议先选取 1-3 个差异大的样本（例如不同类型或分组）进行预实验，熟悉操作流程，根据预实验结果确定或调整样本浓度，以防造成样本或试剂不必要的浪费！

1、样本提取：

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、检测步骤：

① 酶标仪预热 30min，设置温度在 25℃，设定波长到 340nm。

② 在 96 孔板中依次加入：

试剂组分 (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), $\Delta A = (A2 - A1)_{\text{测定}} - (A2 - A1)_{\text{空白}}$ 。		

【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 μL , 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 μL , 则试剂二相应减少。

五、结果计算：

1、按照质量计算：

$$\text{葡萄糖含量}(\text{mg/g 鲜重}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times Mr \times 10^3] \div (W \times V1 \div V) \times D = 1.1439 \times \Delta A \div W \times D$$

2、按照细胞数量计算：

$$\text{葡萄糖含量}(\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times Mr \times 10^6] \div (500 \times V1 \div V) \times D = 1143.9 \times \Delta A \div 500 \times D$$

3、按照体积计算：

$$\text{葡萄糖含量}(\text{mg/mL}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times Mr \times 10^3] \div V1 \times D = 1.1439 \times \Delta A \times D$$

ϵ ---NADPH 的摩尔消光系数, $6.3 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$;

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, $2 \times 10^{-4} \text{ L}$;

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。