

使用说明书

Instruction Manual

葡萄糖-6-磷酸检测试剂盒（可见分光光度法）

6PG Assay Kit (Visible Spectrophotometry)

产品描述

葡萄糖-6-磷酸 (Glucose-6-phosphate, 6PG) 是糖酵解和磷酸戊糖途径的中间产物，广泛存在于动植物体和微生物中。在糖酵解的第一步反应中，葡萄糖被己糖激酶催化生成葡萄糖-6-磷酸，然后通过磷酸葡萄糖异构酶的催化形成果糖-6-磷酸，以继续糖酵解的其它步骤；而在戊糖磷酸途径中，葡萄糖-6-磷酸是其第一个底物，该过程也是生成 NADPH 的主要途径。此外，葡萄糖-6-磷酸也能转化形成糖原或淀粉而被储存起来。

检测原理

6-磷酸葡萄糖脱氢酶可催化 6PG 和 NADP^+ 生成 6 磷酸葡萄糖酸和 NADPH，NADPH 在 1-mPMS 的作用下使 WST-8 显橙黄色，在 450 nm 下测定吸光值。

产品组成及储存条件

50T/24S 规格的产品组成如下：

组成	规格	储存条件
CB0003V-ES	30mL×1 瓶	4℃保存。
CB0003V-A	35mL×1 瓶	4℃保存。
CB0003V-B	粉剂×1 瓶	-20℃保存。
CB0003V-C	3.5mL×1 瓶	4℃避光保存。
CB0003V-Standard	粉剂×1 支	-20℃保存；临用前加入 1mL 蒸馏水，即 10mmol/mL 的标准溶液。

注：正式实验前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预实验。

操作说明

1. 自备用品：

分光光度计、台式离心机、可调式移液器、1mL 玻璃比色皿、研钵、冰、蒸馏水。

2. 样品处理：

- 1) 细菌或培养细胞：先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；按照细菌或细胞数量 (10^4 个)：CB0003V-ES 体积 (mL) 为 500~1000:1 的比例 (建议 500 万细菌或细胞加入 1mL CB0003V-ES)，超声波破碎 (冰浴，功率 20% 或 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次)，8000g，25℃离心 10min，取上清待测。
- 2) 组织：按照组织质量 (g)：CB0003V-ES 体积 (mL) 为 1: 5-10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL CB0003V-ES)，进行冰浴匀浆，8000g，25℃离心 10min，取上清待测。
- 3) 血清 (浆) 等液体样品：直接测定。

3. 检测步骤：

- 1) 分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 450nm，蒸馏水调零。
- 2) 标准液的稀释：将标准液用蒸馏水稀释为 250、200、150、100、50、25nmol/mL 的标准溶液。

3) CB0003V-B 的配制：临用前加入 10mL 水充分溶解待用，剩余试剂分装后-20℃保存。

4) 工作液的配制：临用前按照样本数量，按以下比例配制工作液。

试剂名称	测定工作液 (μL)	对照工作液 (μL)
CB0003V-A	500	500
CB0003V-B	250	
水		250
CB0003V-C	50	50

5) 样本测定：

按下表在 96 孔板中加入如下试剂：

试剂名称 (μL)	测定管	对照管	标准管	空白管
样本	250	250		
标准溶液			250	
蒸馏水				250
测定工作液	750		750	750
对照工作液		750		

37℃避光孵育 30min，450nm 下测定吸光值，分别记为 A 对照、A 测定、A 标准和 A 空白，计算 $\Delta A_{测定} = A_{测定} - A_{对照}$ ， $\Delta A_{标准} = A_{标准} - A_{空白}$ 。每个测定管需设一个对照管。标准曲线和空白管只需测 1-2 次。

4. 6PG 含量计算公式：

1) 标准曲线的绘制

以标准液的浓度 (nmol/mL) 为 x 轴，对应的 $\Delta A_{标准}$ 为 y 轴绘制标准曲线，得到标准方程 $y=kx+b$ ，将 $\Delta A_{测定}$ 代入方程中计算得到样本浓度 (x, nmol/mL)。

2) 6PG 含量的计算：

A. 按照血清（浆）体积计算

$$6PG \text{ 含量 (nmol/mL)} = [x \times V1] \div V1 = x$$

B. 按照蛋白浓度计算

$$6PG \text{ 含量 (nmol/mg prot)} = [x \times V1] \div (V1 \times Cpr) = x \div Cpr$$

C. 按照样品质量计算

$$6PG \text{ 含量 (nmol/g 鲜重)} = [x \times V1] \div (W \times V1 \div V2) = x \div W$$

D. 按照细菌或细胞密度计算

$$6PG \text{ 含量 (nmol/10}^4 \text{ cell)} = [x \times V1] \div (500 \times V1 \div V2) = 0.002x$$

注：V1：加入反应体系中样本体积，0.25mL；V2：加入 CB0003V-ES 体积，1 mL；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；500：细菌或细胞总数，500 万。

注意事项

- 蛋白定量测定，建议使用 TargetMol 生产的 BCA Protein Quantification Kit (C0050)。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

