

果糖-6-磷酸 (F6P) 含量试剂盒说明书

(货号: BP10251F 紫外法 48 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 60mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	粉体 1 支	4°C保存	1. 临用前 8000g 4°C 离心 2min 使试剂落入管底; 2. 加入 1.8mL 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°C保存	1. 临用前 8000g 4°C 离心 2min 使试剂落入管底; 2. 加入 1.8mL 蒸馏水溶解备用。用不完的液体试剂分装后-20°C保存,禁止反复冻融。
试剂三	液体 30mL×1 瓶	4°C保存	
试剂四	液体 1 支	-20°C保存	1. 临用前 8000g 4°C 离心 2min 使试剂落入管底; 2. 加入 1.1mL 蒸馏水溶解备用。用不完的液体试剂分装后-20°C保存,禁止反复冻融。
标准品	粉体 1 支	4°C保存	使用方法: 1. 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 $\mu\text{mol/mL}$,再稀释 40 倍成 0.5 $\mu\text{mol/mL}$ 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); 2. 仅用来鉴定试剂盒中试剂是否正常(不参与结果计算)。

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 石英比色皿、离心管、紫外分光光度计、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 紫外分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 340nm，蒸馏水调零。

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 30:30:560 比例配成混合液（一枪加 620μL 该混合液）（该混合液用多少配多少，现配现用）。

④ 在 1mL 石英比色皿（光径 1cm）中按照下表依次加入试剂：

试剂组分（μL）	测定管	空白管（仅做一次）
试剂一	30	35
试剂二	30	35
试剂三	560	630
样本	80	
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	20	20
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）， $\Delta A = (A2 - A1) \text{ 测定} - (A2 - A1) \text{ 空白}$ 。		

【注】若 ΔA 的差值在零附近徘徊，可增加样本量 V_1 （如增至 300μL，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 V_1 和 W 需代入公式重新计算。

五、结果计算：

1、按样本重量计算：

$$\text{F6P 含量}(\mu\text{g/g 鲜重}) = [(\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times 10^6 \times \text{Mr}) \div (W \times V_1 \div V) \times D] = 365.8 \times \Delta A \div W \times D$$

2、按细胞数量计算：

$$\text{F6P 含量}(\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times 10^6 \times \text{Mr}) \div (500 \times V_1 \div V) \times D] = 0.74 \times \Delta A \times D$$

3、按照液体体积计算：

$$\text{F6P 含量}(\mu\text{g/mL}) = [(\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times 10^6 \times \text{Mr}) \div V_1] = 365.8 \times \Delta A$$

4、按蛋白浓度计算：

$$\text{F6P 含量}(\mu\text{g/mg prot}) = [(\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times 10^6 \times \text{Mr}) \div (C_{\text{pr}} \times V_1 \div V) \times D] = 365.8 \times \Delta A \div C_{\text{pr}} \times D$$

ϵ ---NADH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$ ；

d ---光径，1cm；

V ---加入提取液体积，1 mL；

V_1 ---加入样本体积，0.08mL；

V_2 ---反应总体积；0.7mL= $7 \times 10^{-4} \text{ L}$ ；

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；

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