

Fructose-6-phosphate Content Kit

果糖-6-磷酸 (F6P) 含量试剂盒说明书 (酶法)

货号:BN72264| 方法: 紫外分光法 | 规格: 48 样

一、产品简介:

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:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 60mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉体 mg×1 支	4℃保存	使用前甩几下或离心使试剂落入底部,再加 1.8mL 蒸馏水溶解备用。
试剂二	粉体 mg×1 支	-20℃保存	使用前甩几下或离心使试剂落入底部,再加 1.8mL 蒸馏水溶解备用。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 30mL×1 瓶	4℃保存	
试剂四	液体 μL×1 支	-20℃保存	使用前甩几下或离心使试剂落入底部,再加 1.1mL 蒸馏水溶解备用。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 mg×1 支	4℃保存	仅用来鉴定试剂盒中试剂是否正常(不参与结果计算)。 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 20μmol/mL,再稀释 40 倍成 0.5μmol/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)。

三、所需的仪器和用品:

紫外分光光度计、1mL 石英比色皿(光径 1cm)、台式离心机、可调式移液器、研钵、水浴锅、冰和蒸馏水。

四、果糖-6-磷酸 (F6P) 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℃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（10⁴）：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 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：

试剂名称（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）， $\Delta A = (A2 - A1)$ 测定 - $(A2 - A1)$ 空白。		

注意：本操作流程适用于绝大多数常规样本检测，实验条件可根据实际样本状态适度微调；
针对特殊类型样本，我司技术支持可提供专属优化建议。

五、结果计算：

1、按样本重量计算：

$$\text{F6P 含量}(\mu\text{g/g 鲜重}) = [(\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^6 \times Mr) \div (W \times V1 \div V) \times D = 365.8 \times \Delta A \div W \times D$$

2、按细胞数量计算：

$$\text{F6P 含量}(\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^6 \times Mr) \div (500 \times V1 \div V) \times D = 0.74 \times \Delta A \times D$$

3、按照液体体积计算：

$$\text{F6P 含量}(\mu\text{g/mL}) = [(\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^6 \times Mr) \div V1 = 365.8 \times \Delta A$$

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

V---加入提取液体积，1 mL；

V2---反应总体积； $0.7 \text{ mL} = 7 \times 10^{-4} \text{ L}$ ；

Mr---果糖-6-磷酸（F6P）分子量；260；

D---稀释倍数，未稀释即为 1。

d---光径，1cm；

V1---加入样本体积，0.08mL；

W---样本质量，g；

500---细胞数量，万；