

M5 HiPer 葡萄糖含量检测试剂盒

使用说明书

Product	Unit	Cat.#
M5 HiPer 葡萄糖含量检测试剂盒	100T/96S	MF1120-01

【保存温度】 2-8°C保存

【产品简介】

测定意义：葡萄糖不仅是细胞能量代谢的主要底物，而且其代谢中间产物是生物合成的重要底物。植物可通过光合作用产生葡萄糖。就哺乳动物而言，葡萄糖不仅是大脑神经系统、肌肉、脂肪组织等的唯一能源，而且与还原性辅酶、乳糖和乳脂的合成密切相关。

测定原理：葡萄糖氧化酶催化葡萄糖氧化成葡萄糖酸，并产生过氧化氢；过氧化物酶催化过氧化氢氧化 4-氨基安替比林偶联酚，生成有色化合物，在 505 nm 有特征吸收峰。

【产品组成】

试剂一 10mL
试剂二 10 mL
试剂三 10 mL

溶液的配制：1、试剂一：2 μ mol/mL 葡萄糖溶液；2、混合试剂的配制：使用前将试剂二和试剂三 1: 1 等体积混合，用多少配多少。

【需自备的仪器和用品】

可见分光光度计/酶标仪、水浴锅、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔板、研钵和蒸馏水

【技术指标】：

最低检出限：0.02 μ mol/mL 线性范围：0.03-5 μ mol/mL，实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

【操作步骤】

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

1. 组织的处理：按照组织质量（g）：蒸馏水体积（mL）为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入1mL 蒸馏水），研磨成匀浆，置沸水浴中煮沸 10 min（盖紧，防止水分散失），冷却至室温后，8000g，25°C离心 10min，取上清液备用。
2. 细菌或细胞处理：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（10⁴ 个）：蒸馏水体积（mL）为 500~1000: 1 的比例（建议 500 万细菌或细胞加入 1mL 蒸馏水），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），置沸水浴中煮沸 10min（盖紧，防止水分散失），冷却后，8000g，25°C离心 10min，取上清液备用。

二、测定步骤

- 1、分光光度计或酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 505nm，分光光度计用蒸馏水调零。
- 2、样本测定（在 1.5mL EP 管或 96 孔板中依次加入下列试剂）：

试剂 (μL)	空白管	标准管	测定管
上清液	-	-	20
试剂一	-	20	-
蒸馏水	20	-	-
混合试剂	180	180	180

涡旋混匀，置于 37°C 水浴锅/恒温培养箱反应 15min 后，于 505nm 波长处读取吸光度 A，分别记为 A 空白、A 标准和 A 测定。计算 ΔA 测定 = A 测定 - A 空白， ΔA 标准 = A 标准 - A 空白。（空白管和标准管只需测 1-2 次）。

三、葡萄糖含量计算

1、按样本蛋白浓度计算葡萄糖含量 ($\mu\text{mol}/\text{mg prot}$) = $(C_{\text{标准}} \times V_1) \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div (V_1 \times C_{\text{pr}}) = 2 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div C_{\text{pr}}$

2、按样本质量计算葡萄糖含量 ($\mu\text{mol}/\text{g 质量}$) = $(C_{\text{标准}} \times V_1) \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div (W \times V_1 \div V_2) = 2 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div W$

3、按细菌或细胞数量计算葡萄糖含量 ($\mu\text{mol}/10^6 \text{ cell}$) = $(C_{\text{标准}} \times V_1) \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div (5 \times V_1 \div V_2) = 0.4 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}}$

C 标准：标准管浓度， $2 \mu\text{mol}/\text{mL}$ ；V1：加入样本体积， $20 \mu\text{L} = 0.02 \text{mL}$ ；V2：样本总体积， 1mL ；Cpr：样本蛋白质浓度， mg/mL ；W：样本质量，g；5：细菌或细胞总数（以 10^6 计）， 5×10^6 个。

【注意事项】

若 (A 测定 - A 空白) 小于 0.005，建议加大提取样本质量（或细胞数量）或者样本上清液的加入量；(A 测定 - A 空白) 大于 1.2，将上清液用蒸馏水稀释即可。计算公式中注意乘以稀释倍数。

【实验实例】

1. 取 0.1g 小鼠肝脏加入 1mL 蒸馏水进行前处理步骤，离心取上清后按测定步骤测定，用 96 孔板测得吸光值 ΔA 测定 = A 测定 - A 空白 = $0.856 - 0.051 = 0.805$ ， ΔA 标准 = A 标准 - A 空白 = $0.724 - 0.051 = 0.673$ 。按样本质量计算葡萄糖含量 ($\mu\text{mol}/\text{g 质量}$) = $2 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div W = 2 \times 0.805 \div 0.673 \div 0.1 = 23.923 \mu\text{mol}/\text{g 质量}$

2. 取 0.1g 绿萝叶片加入 1mL 蒸馏水进行前处理步骤，离心取上清后按测定步骤测定，用 96 孔板测得吸光值 ΔA 测定 = A 测定 - A 空白 = $0.318 - 0.051 = 0.267$ ， ΔA 标准 = A 标准 - A 空白 = $0.724 - 0.051 = 0.673$ 。按样本质量计算葡萄糖含量 ($\mu\text{mol}/\text{g 质量}$) = $2 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div W = 2 \times 0.267 \div 0.673 \div 0.1 = 7.935 \mu\text{mol}/\text{g 质量}$

3. 取 5 百万 Jurkat 细胞样本加入 1mL 蒸馏水进行前处理步骤，离心取上清后按测定步骤测定，用 96 孔板测得吸光值 ΔA 测定 = A 测定 - A 空白 = $0.057 - 0.051 = 0.007$ ， ΔA 标准 = A 标准 - A 空白 = $0.724 - 0.051 = 0.673$ 。按细胞数量计算葡萄糖含量 ($\mu\text{mol}/10^6 \text{ cell}$) = $0.4 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} = 0.4 \times 0.007 \div 0.673 = 4.16 \times 10^{-3} \mu\text{mol}/10^6 \text{ cell}$