

## 葡萄糖-6-磷酸( Glucose 6-phosphate, 6P G)含量测定试剂盒说明书

微量法 100管/48样

正式测定前务必取2-3个预期差异较大的样本做预测定

### 测定意义：

6PG (Glucose-6-phosphate, 葡萄糖-6-磷酸, 又称6-磷酸葡萄糖), 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。

### 测定原理：

6-磷酸葡萄糖脱氢酶可催化6PG和NADP<sup>+</sup>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。

### 自备实验用品及仪器：

酶标仪、台式离心机、可调式移液器、96孔板、研钵、冰、蒸馏水。

试剂的组成和配制：

提取液：液体60 mL×1瓶, 4°C保存;

试剂一：液体12mL×1瓶, 4°C保存;

试剂二：粉剂×1瓶, -20°C保存;

试剂三：液体1.5mL×1管, 4°C避光保存。

### 葡萄糖-6-磷酸( Glucose 6-phosphate, 6P G)含量测定试剂盒说明书提取：

- 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) : 提取液体积 (mL) 为500~1000: 1的比例 (建议500万细菌或细胞加入1mL提取液), 超声波破碎 (冰浴, 功率20%或200W, 超声3s, 间隔10s, 重复30次), 8000g, 25°C离心10min, 取上清待测。
- 2、组织：按照组织质量 (g) : 提取液体积(mL)为1: 5~10的比例 (建议称取约0.1g组织, 加入1mL提取液), 进行冰浴匀浆, 8000g, 25°C离心10min, 取上清待测。
- 3、血清 (浆) 等液体样品：直接测定。

测定步骤：

- 1、酶标仪预热30min以上, 调节波长至450nm。
- 2、试剂二的配制：临用前加入3mL水充分溶解待用, 用不完的试剂分装后-20°C保存;
- 3、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 (μL)	测定工作液	对照工作液
试剂一	100	100
试剂二	50	
水		50
试剂三	10	10

#### 4、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
样本	50	50
测定工作液	150	
对照工作液		150

37°C避光孵育30min, 450nm下测定吸光值A测定与A对照,  $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ 。每个测定管需设一个对照管。

6PG含量计算:

1、标准条件下测定回归方程为 $y = 3.8589x - 0.0016$ ,  $R^2 = 0.997$ ;  $x$ 为6PG含量 ( $\mu\text{mol/mL}$ ),  $y$ 为吸光值。

2、按照血清(浆)体积计算

$$\begin{aligned} \text{6PG含量 (nmol/mL)} &= [(\Delta A + 0.0016) \div 3.8589 \times V1] \div V1 \times 1000 \\ &= 259.1 \times (\Delta A + 0.0016) \end{aligned}$$

3、按照蛋白浓度计算

$$\begin{aligned} \text{6PG含量 (nmol/mg prot)} &= [(\Delta A + 0.0016) \div 3.8589 \times V1] \div (V1 \times Cpr) \times 1000 \\ &= 259.1 \times (\Delta A + 0.0016) \div Cpr \end{aligned}$$

4、按照样品质量计算

$$\begin{aligned} \text{6PG含量 (nmol/g鲜重)} &= [(\Delta A + 0.0016) \div 3.8589 \times V1] \div (W \times V1 \div V2) \times 1000 \\ &= 259.1 \times (\Delta A + 0.0016) \div W \end{aligned}$$

3、按照细菌或细胞密度计算

$$\begin{aligned} \text{6PG含量 (nmol/10}^4 \text{ cell)} &= [(\Delta A + 0.0016) \div 3.8589 \times V1] \div (500 \times V1 \div V2) \times 1000 \\ &= 0.518 \times (\Delta A + 0.0016) \end{aligned}$$

V1: 加入反应体系中样本体积, 0.05mL; V2: 加入提取液体积, 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；1000， $\mu\text{mol}$ 到 $\text{nmol}$ 的换算系数。

---

[www.pyram.cn](http://www.pyram.cn)