

葡萄糖含量试剂盒说明书（测组织、细菌或细胞）

微量法 100管/96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：

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。

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

试剂的组成和配制：

试剂一：0.5 μ mol/mL葡萄糖溶液10mL \times 1瓶，4 $^{\circ}$ C保存；

试剂二：液体 10ml \times 1瓶，4 $^{\circ}$ C保存；

试剂三：液体 10ml \times 1瓶，4 $^{\circ}$ C保存；

葡萄糖提取：

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，95 $^{\circ}$ C水浴10分钟（盖紧，防止水分散失），冷却后，8000g，25 $^{\circ}$ 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20%或200W，超声3S，间隔10S，重复30次），95 $^{\circ}$ C水浴10分钟（盖紧，防止水分散失），冷却后，8000g，25 $^{\circ}$ C离心10min，取上清液备用。

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，蒸馏水调零。

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。

3、加样表（在EP管或96孔板中加入下列试剂）：

试剂（ μ L）	空白管	标准管	测定管
样本			20
试剂一		20	
蒸馏水	20		
混合试剂	180	180	180

混匀，置37°C（哺乳动物）或25°C（其它物种）保温15min后，于505nm波长处读取吸光度。空白管、标准管和测定管吸光值分别记为A1、A2和A3。空白管和标准管只要做一管。

葡萄糖含量计算：

1、按样本蛋白浓度计算

$$\text{葡萄糖含量}(\mu\text{mol}/\text{mg prot}) = (\text{C标准} \times \text{V1}) \times (\text{A3} - \text{A1}) \div (\text{A2} - \text{A1}) \div (\text{V1} \times \text{Cpr}) = 0.5 \times (\text{A3} - \text{A1}) \div (\text{A2} - \text{A1}) \div \text{Cpr}。$$

2、按样本鲜重计算

$$\text{葡萄糖含量}(\mu\text{mol}/\text{g 鲜重}) = (\text{C标准} \times \text{V1}) \times (\text{A3} - \text{A1}) \div (\text{A2} - \text{A1}) \div (\text{W} \times \text{V1} \div \text{V2}) = 0.5 \times (\text{A3} - \text{A1}) \div (\text{A2} - \text{A1}) \div \text{W}$$

3、按细菌或细胞密度计算

$$\text{葡萄糖含量}(\mu\text{mol}/10^4 \text{ cell}) = (\text{C标准} \times \text{V1}) \times (\text{A3} - \text{A1}) \div (\text{A2} - \text{A1}) \div (500 \times \text{V1} \div \text{V2}) = 0.001 \times (\text{A3} - \text{A1}) \div (\text{A2} - \text{A1})$$

C标准：标准管浓度，0.5 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ ；V1：加入样本体积，0.1mL；V2：加入提取液体积，1mL；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本鲜重，g；500：细菌或细胞总数，500万。**注意：最低检测限为50nmol/g鲜重或0.5nmol/mg prot**