

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 540 nm 有特征吸收峰。

需自备的仪器和用品：

酶标仪、水浴锅、可调式移液器、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：粉剂 \times 1 瓶，-20 $^{\circ}$ C 保存；临用前加入 10mL 试剂四溶解待用，用不完的试剂 4 $^{\circ}$ C 保存；

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

试剂四：液体 12ml \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（ 10^4 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、酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 540nm。

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 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 $^{\circ}$ C 保温 15min 后，于 540nm 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

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

2、按样本鲜重计算

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

3、按细菌或细胞密度计算

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

C 标准: 标准管浓度, $0.5\mu\text{mol/mL}$; 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:

1、最低检测限为 50nmol/g 鲜重或 0.5nmol/mg prot.

2、A3 大于 2 的时候, 说明样本葡萄糖浓度过高, 需要用蒸馏水适当稀释后测定, 并且在计算结果中乘以相应稀释倍数。