

葡萄糖(Glucose)(GOPOD 氧化酶法)含量试剂盒说明书

(分光法 48 样)

一、产品简介:

葡萄糖 ($C_6H_{12}O_6$, FW: 180.16), 是产生能量分子ATP的主要来源。本试剂盒提供一种定量、快速、简单、灵敏的检测方法, 葡萄糖被特异性氧化以产生与显色剂反应的 (粉) 红色产物, 该产物在520nm有最大吸收峰, 进而得到葡萄糖含量。

二、试剂盒组分与配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
试剂一	液体 4mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	二 A: 液体 26mL×1 瓶 二 B: 液体 13mL×1 瓶	4℃保存	临用前按照试剂二 A:二 B=2:1 的比例混合制备成 试剂二 mix (建议该混合液用多少配多少, 且避光保存, 且一周内用完)。
标准管	粉体 mg×1 支	室温干燥保存	用前准确称取 2mg 粉体即葡萄糖至一新 EP 管中, 再加 2mL 蒸馏水充分溶解即得 1mg/mL 标准品, 再用蒸馏水稀释成 0.5mg/mL, 待用。(该标准品粉体开封后也需干燥保存和使用)

三、所需仪器和用品:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm)、天平、移液器、研钵、离心机、蒸馏水。

四、葡萄糖含量检测:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品和实验流程, 避免样本和试剂浪费

1、样本制备:

- ① 组织样本: 0.1g 组织样本 (水分充足的样本建议取 0.2g 左右), 加 1mL 的蒸馏水研磨, 粗提液全部转移到 EP 管中, 12000rpm, 常温离心 10min, 上清液待测。
- ② 细胞样本: 先收集细胞到离心管内, 离心后弃上清; 取约 500 万细胞加入 1mL 蒸馏水或 PBS 或生理盐水, 超声波破碎细胞 (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, 可按照细胞数量(10^4): 提取液(mL)为 500~1000: 1 的比例进行提取。

- ③ 液体样品: 澄清的液体样本直接检测, 若浑浊则需离心后取上清液测定。

2、上机检测:

- ① 可见分光光度计预热 30min, 设置温度在 25℃, 设定波长到 520nm, 蒸馏水调零。
- ② 做实验前选取 2 个样本, 找出适合本次检测样本的稀释倍数 D。如: 果实类样本, 需稀释 5-10 倍。
- ③ 在 EP 管或 1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm) 中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管	空白管 (仅做一次)	标准管 (仅做一次)
样本	40		
蒸馏水		40	
标准品			40
试剂一	80	80	80
试剂二 mix	680	680	680
混匀, 37℃避光反应 30min, 若是在 EP 管中操作需全部转移至 1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm) 中, 于 520nm 下读取吸光值 A, $\Delta A_{\text{葡萄糖}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$			

- 【注】：1.若待检测样本有强背景色（如粉色，红色等），需做一个样本自身对照：即 40 μ L 样本+80 μ L 蒸馏水+680 μ L 试剂二，37 $^{\circ}$ C避光反应 30min，520nm 下读取吸光值 A， ΔA 葡萄糖=A 测定-A 对照。
- 2.测定管的 A 值若超过 1.5，可把样本用蒸馏水进行稀释，稀释倍数 D 代入计算公式。
- 3.若 ΔA 小于 0.01，可增加样本加样体积 V1（如由 40 μ L 增至 80 或 120 μ L 或更多，则试剂二相应减少），空白管和标准管保持不变；或增加样本取样质量 W 或细胞取样数量。则改变后的 V1 和 W 和细胞数量需代入计算公式重新计算。

五、结果计算：

1、按照质量计算：

$$\begin{aligned}\text{葡萄糖含量(mg/g 鲜重)} &= (C \text{ 标准} \times V1) \times \Delta A \text{ 葡萄糖} \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \div (W \times V1 \div V) \times D \\ &= 0.5 \times \Delta A \text{ 葡萄糖} \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \div W \times D\end{aligned}$$

2、按照细胞数量计算：

$$\begin{aligned}\text{葡萄糖含量(mg/10}^4\text{ cell)} &= (C \text{ 标准} \times V1) \times \Delta A \text{ 葡萄糖} \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \div (500 \times V1 \div V) \times D \\ &= 0.5 \times \Delta A \text{ 葡萄糖} \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \div 500 \times D\end{aligned}$$

3、按照体积计算：

$$\begin{aligned}\text{葡萄糖含量(mg/mL)} &= (C \text{ 标准} \times V1) \times \Delta A \text{ 葡萄糖} \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \div V1 \times D \\ &= 0.5 \times \Delta A \text{ 葡萄糖} \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \times D\end{aligned}$$

C 标准---葡萄糖标准品的浓度，0.5mg/mL； D---稀释倍数，未稀释即为 1；

V---加入提取液体积，1mL；

V1---加入样本体积，0.04mL；

W---样本鲜重，g；

500---细胞数量，万。