天净沙系列

CAT#: 7-C56-12-2

低温运输，-20℃保存

天净沙

D-果糖-6-磷酸含量测定试剂盒

D-fructose 6-phosphate Assay Kit

使用手册 V0.8

北京天净沙基因科技有限公司

网址：www.tjs.bio；电话：400-1078566；电邮：order@tjs.bio

产品及特点

本产品是 D-果糖-6-磷酸含量测定试剂盒，是一种基于 WST-8 的显色反应，通过比色法，快速、高灵敏地对组织或细胞样品、血清和血浆等生物体液以及组织或细胞培养上清样品中果糖-6-磷酸含量进行检测的试剂盒。其原理利用是 D-果糖-6-磷酸能与特定反应物发生反应最后生成在 450 nm 有光吸收的物质，通过测定该波长下的光吸收即可测定各种生物样本中 D-果糖-6-磷酸的含量。本产品有如下特点:

1. 操作简单快捷。
2. 即开即用，用户不用单独准备各种试剂。
3. 使用灵活、速度快、适用范围广。可检测小鼠、大鼠、人等的血清、血浆、尿液等生物体液，细胞培养上清、组织或细胞样品等样品的检测。全程约 0.5-1 小时即可完成。
4. 检测灵敏度高，线性范围宽，样品用量少。本产品在样品体积为 20 μL 时，检测下限 5 μM、线性范围在 5 μM-2 mM 内有良好的线性关系。
5. 本产品足够 100 次的 96 孔板检测。
6. 本产品只能用于科研。

规格及成分

本产品使用小扁盒包装

成份	编号	规格	包装
D-果糖-6-磷酸测定缓冲液 A	7-C56-12-2a	20 mL	30 mL 本色瓶
D-果糖-6-磷酸测定缓冲液 B	7-C56-12-2b	20 mL	30 mL 本色瓶
D-果糖-6-磷酸测定底物	7-C56-12-2c	200 μL	1 mL 本色管
D-果糖-6-磷酸测定酶溶液 A	7-C56-12-2d	200 μL	1 mL 蓝盖管
D-果糖-6-磷酸测定酶溶液 B	7-C56-12-2e	200 μL	1 mL 红盖管
WST-8	7-C56-12-2f	200 μL	1 mL 黄盖管
D-果糖-6-磷酸测定标准品 (100 mM)	7-C56-12-2g	200 μL	1 mL 绿盖管
使用手册	7-C56-12-2sc	1 份	无

运输及保存

低温运输，-20℃保存，其中 WST-8 须避光保存。有效期一年。

自备物品

超纯水、分光光度计

使用方法

一、样品准备

1. 血液样品。

a) 对于血清样品，将全血在常温如 25℃下放置 30 分钟至 2 小时，不要剧烈摇晃以免溶血，待全血自然凝固并析出血清后，4℃约 1000-2000×g 离心 10 分钟，取黄色上清即得血清，注意不要吸取沉淀；

b) 对于血浆样品，将全血用肝素或者 EDTA 进行抗凝，4℃约 1000-2000×g 离心 10 分钟，取黄色或淡黄色上清即得血浆，注意不要吸取沉淀。

c) 血清和血浆都需置于冰上，如果不能立即检测，也可以分装并短期保存于-20℃或-80℃。对于冻存的样品，解冻后需冰浴存放备用，使用前必须混匀。

2. 细胞或组织样品。

a) 对于培养的贴壁细胞，PBS 洗涤一次并吸净残留液体。

b) 对于培养的悬浮细胞，先适当离心(如 100-500×g，5 分钟)收集细胞到离心管内，弃上清并吸净残留液体。按照每 100 万细胞加入 100-200 μL D-果糖-6-磷酸测定缓冲液 A 的比例加入裂解液，适当吹打，冰浴 5-10 分钟以充分裂解细胞。4℃约 12,000×g 离心 3-5 分钟，取上清用于后续检测。

c) 对于组织样品，按照每 10 mg 组织加入 100 μL D-果糖-6-磷酸测定缓冲液 A 的比例，使用高通量组织研磨仪、手持式组织研磨仪或玻璃匀浆器在约 4℃或冰浴等低温条件下进行匀浆。4℃约 12,000×g 离心 3-5 分钟，取上清用于后续检测。

d) 以上所有操作均需在 4℃或冰上操作。制备好的细胞或组织样品如果不能立即检测，可以-20℃或-80℃冻存。

3. 细胞培养上清。

a) 对于贴壁细胞，直接取培养液。

b) 对于悬浮细胞，离心取培养液。

二、试剂盒准备

4. 溶解 D-果糖-6-磷酸测定缓冲液 A、D-果糖-6-磷酸测定缓冲液 B 和 D-果糖-6-磷酸测定底物，平衡至室温后混匀备用。其它试剂存放于冰浴备用，使用完毕后宜立即按照试剂盒要求的条件保存。

5. WST-8 显色工作液的配制：按照每个检测反应 80 μL 的体积配制适量的 WST-8 显色工作液。（配制好的 WST-8 显色工作液如果置于 4℃或冰浴避光保存，可以在当天使用，但建议尽量现配现用。）具体配制方法参考下表:

成分	含量/μL
D-果糖-6-磷酸测定缓冲液 B	72
D-果糖-6-磷酸测定底物	2
D-果糖-6-磷酸测定酶溶液 A	2
D-果糖-6-磷酸测定酶溶液 B	2
WST-8	2
WST-8 显色工作液	80

	注意: 1. 由于酶溶液的用量较少且易沉降，必须注意在使用前先轻轻离心一下，然后适当混匀后再使用。 2. 若样品含有葡萄糖-6-磷酸、NADH、NADPH 等干扰，须同时设置样品背景对照孔，即配制 WST-8 显色工作液时，2 μL D-果糖-6-磷酸测定酶溶液 A 用 D-果糖-6-磷酸测定缓冲液 B 替代。计算时样品孔的读数需减去样品背景对照孔的读数。 三、样品测定 1. 果糖-6-磷酸标准曲线设置。 取 2 μL D-果糖-6-磷酸测定标准品（100 mM），加入 98 μL D-果糖-6-磷酸测定缓冲液 B，混匀，配制成浓度为 2 mM 的果糖-6-磷酸标准溶液。分别取 2 mM 的果糖-6-磷酸标准溶液 0、0.5、1、2、5、10、20 μL 加入 96 孔板的标准品孔中，并用 D-果糖-6-磷酸测定缓冲液 B 补足到 20 μL，此时标准曲线的浓度为 0、50、100、200、500、1000、2000 μM。 2. 加入 1-20 μL 样品或稀释后的样品到 96 孔板样品孔中，并相应地再加入 D-果糖-6-磷酸测定缓冲液 B 至样品孔中，补足到 20 μL。同时设置仅含 D-果糖-6-磷酸测定缓冲液 B 的孔为空白对照孔。 注：为确保数值在标准曲线范围内，建议进行预实验将样品同时设定多个稀释倍数，以确定样品中果糖-6-磷酸的大致浓度。如果数值不在标准曲线范围内，可调整样品的稀释倍数或者样品的量。样品总稀释倍数记为 n。 3. 各孔加入 WST-8 显色工作液 80 μL，混匀，37℃避光反应 20 分钟。 注：如果吸光度偏低，可适当延长反应时间，例如反应 30 或 45 分钟。 4. 在 450 nm 测定吸光度。 5. 建立标准曲线，并计算样品中果糖-6-磷酸的浓度(记录为 A)，如果样品背景对照孔吸光度比较高，样品的吸光度需要减去样品背景对照的吸光度。果糖-6-磷酸浓度的计算公式如下: C (μM) = A × n 注：A 为根据标准曲线确定的稀释后的样品果糖-6-磷酸浓度（μM）； n 为样品总稀释倍数； 可根据果糖-6-磷酸的分子量 260.13 计算出样品中果糖-6-磷酸的质量浓度（μg/mL） = C × 0.26013。
关联产品	D-果糖-6-磷酸含量测定试剂盒（酶联法）