

## 果糖-6-磷酸检测试剂盒(WST-8法)

产品编号	产品名称	包装
S0183S	果糖-6-磷酸检测试剂盒(WST-8法)	100次

### 产品简介:

- 碧云天研发的果糖-6-磷酸检测试剂盒(WST-8法) (Fructose-6-phosphate Assay Kit with WST-8), 也称6-磷酸果糖检测试剂盒(WST-8法)或F6P Assay Kit with WST-8, 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。
- 果糖-6-磷酸(Fructose-6-phosphate, F6P), 也称6-磷酸果糖, 分子式为 $C_6H_{13}O_9P$ , 分子量为260.13, 是果糖的磷酸化产物。F6P是细胞代谢的重要代谢中间产物, 在糖酵解途径中, 葡萄糖-6-磷酸(Glucose-6-phosphate, G6P)被磷酸葡萄糖异构酶(Phosphoglucose isomerase, PGI)异构化为F6P, F6P在启动糖原合成中发挥作用, 同时也参与己糖胺途径和己糖单磷酸分流通路[1]。此外, F6P也参与磷酸戊糖途径(Pentose Phosphate Pathway, PPP)的非氧化分支, 以生成用于核苷酸合成的戊糖磷酸和用于芳香族氨基酸自养型生物(Aromatic amino acid autotrophs)中各种芳香族代谢物和组氨酸生物合成的前体4-磷酸赤藓糖(Erythrose 4-phosphate) [2]。
- 本试剂盒的检测原理请参考图1。果糖-6-磷酸(F6P)被磷酸葡萄糖异构酶(PGI)异构化为葡萄糖-6-磷酸(G6P), 生成的葡萄糖-6-磷酸在葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(Glucose-6-phosphate dehydrogenase, G6PDH)的作用下氧化生成6-磷酸葡萄糖酸内酯(6-phosphogluconate, 6-PG), 在这一反应过程中 $NADP^+$ 被还原为NADPH; 生成的NADPH在电子耦合试剂(Electron mediator)的作用下将WST-8还原生成橙黄色的Formazan, 在450nm左右有最大吸收峰。反应体系中生成的Formazan与样品中果糖-6-磷酸的含量成正比。

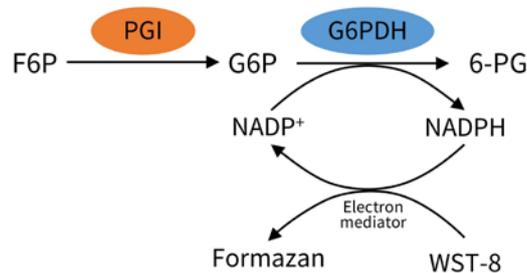


图1. 碧云天果糖-6-磷酸检测试剂盒(WST-8法) (S0183)检测原理图。

- **本试剂盒检测灵敏度高, 线性范围宽, 样品用量少。**本试剂盒在样品体积为20 $\mu$ l时可以检测浓度低至5 $\mu$ M的果糖-6-磷酸, 在5-2000 $\mu$ M (0.1-40nmol)浓度范围内有良好的线性关系。本试剂盒提供了果糖-6-磷酸标准溶液, 可以通过设置标准曲线(图2), 从而计算出样品中的果糖-6-磷酸含量。

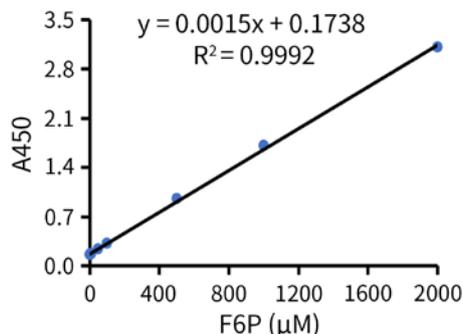


图2. 碧云天果糖-6-磷酸检测试剂盒(WST-8法) (S0183)检测果糖-6-磷酸标准品的标准曲线。各浓度果糖-6-磷酸标准品加入WST-8显色工作液后, 37 $^{\circ}$ C孵育20分钟, 测定A450, 在5-2000 $\mu$ M浓度范围内有良好的线性关系。实际检测数据会因实验条件、检测仪器等的不同而存在差异, 图中数据仅供参考。

- **本试剂盒提供的检测裂解液有一定的通用性。**使用本试剂盒中的BeyoLysis<sup>TM</sup> Buffer A for Metabolic Assay裂解获得的细胞或组织样品, 也可以用于碧云天生产的其它代谢类试剂盒中同样使用BeyoLysis<sup>TM</sup> Buffer A for Metabolic Assay进行裂解的样品检测, 通用性强; 而且还可用于检测蛋白浓度、进行SDS-PAGE或一些较易溶解蛋白的Western检测。

- **本试剂盒使用灵活，检测速度快，适用范围广。**本试剂盒可用于小鼠、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。本试剂盒不仅适合少量样品的检测，也非常适合高通量筛选 (High-throughput screening)的自动化操作系统。
- 按照使用说明操作，用于96孔板检测时，本试剂盒小包装可以进行100次检测。

### 包装清单：

产品编号	产品名称	包装
S0183S-1	BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay	20ml
S0183S-2	F6P Assay Buffer	20ml
S0183S-3	Substrate	200μl
S0183S-4	Enzyme Solution A	200μl
S0183S-5	Enzyme Solution B	200μl
S0183S-6	WST-8	200μl
S0183S-7	F6P Standard (100mM)	200μl
—	说明书	1份

### 保存条件：

-20°C保存，一年有效。其中WST-8须避光保存。

### 注意事项：

- BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay、F6P Assay Buffer和Substrate需要完全解冻并平衡至室温后再使用，否则会影响检测结果。其它溶液使用时应在冰上进行。
- Substrate从-20°C取出在融解过程中可能会有析出，平衡至室温后析出的部分会复溶，不会对检测结果产生影响。
- 血清等样品如在4°C保存，保存时间不得超过2周，否则会影响检测结果的准确性。通常血清样品宜-20°C保存，-80°C保存更佳。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

### 使用说明：

#### 1. 样品的准备。

- 血液样品的准备：对于血清样品，将全血在常温如25°C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°C约1000-2000×g离心10分钟，取黄色上清即得血清，注意不要吸取白色或淡黄色沉淀；对于血浆样品，将全血用肝素或者EDTA进行抗凝，4°C约1000-2000×g离心10分钟，取黄色或淡黄色上清即得血浆，注意不要吸取白色沉淀。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°C或-80°C。对于冻存的样品，在检测前解冻后冰浴存放备用，使用前必须混匀。
- 细胞或组织样品的准备：对于培养的贴壁细胞，PBS (C0221A)洗涤一次并吸净残留液体。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100-200μl BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay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°C约12,000×g离心3-5分钟，取上清用于后续检测。对于组织样品，按照每10mg组织加入100μl BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay的比例，使用TissueMaster™高通量组织研磨仪(1.5/2ml×48) (E6618)、TissueMaster™手持式组织研磨仪(E6600/E6607)或玻璃匀浆器在约4°C或冰浴等低温条件下进行匀浆。4°C约12,000×g离心3-5分钟，取上清用于后续检测。以上所有操作均需在4°C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°C或-80°C冻存。
- 细胞培养上清样品的准备：对于贴壁细胞，直接取培养液；对于悬浮细胞，离心取培养液。

#### 2. 试剂盒的准备。

- 融解BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay、F6P Assay Buffer和Substrate，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。
- WST-8显色工作液(WST-8 Working Solution)的配制：按照每个检测反应80μl的体积配制适量的WST-8显色工作液。均匀混合72μl F6P Assay Buffer、2μl Substrate、2μl Enzyme Solution A、2μl Enzyme Solution B、2μl WST-8，即可配制成80μl WST-8显色工作液。根据待检测样品(包括标准品)的数量，配制适量的WST-8显色工作液。具体配制方法参考下表。配制好的WST-8显色工作液如果置于4°C或冰浴避光保存，可以在当天使用，但建议尽量现配现用。

Samples	1	10	20	50
F6P Assay Buffer (μl)	72	720	1440	3600
Substrate (μl)	2	20	40	100
Enzyme Solution A (μl)	2	20	40	100
Enzyme Solution B (μl)	2	20	40	100
WST-8 (μl)	2	20	40	100
<b>WST-8 Working Solution (μl)</b>	<b>80</b>	<b>800</b>	<b>1600</b>	<b>4000</b>

注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。

注2: 葡萄糖-6-磷酸、NADH、NADPH等的存在会对果糖-6-磷酸的检测产生干扰。如果样品含有葡萄糖-6-磷酸、NADH、NADPH, 须同时设置样品背景对照孔, 加入不含Enzyme Solution A的显色工作液, 即配制WST-8显色工作液时2 $\mu$ l Enzyme Solution A用F6P Assay Buffer替代。计算时样品孔的读数需要减去样品背景对照孔的读数。

### 3. 样品测定。

#### a. 果糖-6-磷酸标准曲线设置。

取2 $\mu$ l F6P Standard (100mM), 加入98 $\mu$ l F6P Assay Buffer, 混匀, 配制成浓度为2mM的果糖-6-磷酸标准溶液。分别取2mM的果糖-6-磷酸标准溶液0、0.5、1、2、5、10、20 $\mu$ l加入96孔板的标准品孔中, 并用F6P Assay Buffer补足到20 $\mu$ l, 此时标准曲线的浓度为0、50、100、200、500、1000、2000 $\mu$ M。

#### b. 加入1-20 $\mu$ l样品或稀释后的样品到96孔板样品孔中, 并相应地再加入F6P Assay Buffer至样品孔中, 补足到20 $\mu$ l。同时设置仅含F6P Assay Buffer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 (例如本步骤中对样品进行了10倍稀释, 加入的‘稀释后的样品’为5 $\mu$ l, 则n=10 $\times$ 20/5=40)。

#### c. 各孔加入WST-8显色工作液80 $\mu$ l, 混匀, 37 $^{\circ}$ C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。

#### d. 在450nm测定吸光度。

#### e. 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-磷酸标准曲线可以参考图2, 在5-2000 $\mu$ M浓度范围内有良好的线性关系。果糖-6-磷酸浓度的计算公式如下:

$$C(\mu\text{M})=A \times n$$

注: A为步骤3e根据标准曲线确定的稀释后的样品果糖-6-磷酸浓度( $\mu$ M);

n为步骤3b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( $\mu$ g/ml)=C $\times$ 0.26013。

### 参考文献:

1. Donthi RV, Ye G, Wu C, McClain DA, Lange AJ, et al. J Biol Chem. 2004. 279(46):48085-48090.
2. Stincone A, Prigione A, Cramer T, Wamelink M. M, Campbell K, et al. Biol Rev Camb Philos Soc. 2015. 90(3):927-963.

### 相关产品:

产品编号	产品名称	包装
C0016/C0017	乳酸脱氢酶细胞毒性检测试剂盒	100次/500次
C0018	乳酸脱氢酶细胞毒性检测试剂盒(WST-8法)	100次/500次
C0019	乳酸脱氢酶释放检测试剂盒(WST-8法)	100次/500次
S0110S	黄嘌呤氧化酶活性检测试剂盒(WST-8法)	100次
S0111S	黄嘌呤氧化酶抑制剂筛选试剂盒(WST-8法)	100次
S0112	Amplex Red黄嘌呤氧化酶活性检测试剂盒	100次/500次
S0113S	Amplex Red黄嘌呤氧化酶抑制剂筛选试剂盒	100次
S0114S	黄嘌呤/次黄嘌呤检测试剂盒(WST-8法)	100次
S0183S	果糖-6-磷酸检测试剂盒(WST-8法)	100次
S0185	G6P检测试剂盒(WST-8法)	100次
S0187S	磷酸葡萄糖异构酶活性检测试剂盒(WST-8法)	100次
S0189	G6PDH活性检测试剂盒(WST-8法)	100次
S0201	葡萄糖检测试剂盒(O-toluidine法)	200次/1000次
S0202S	葡萄糖检测试剂盒(显色法)	100次
S0204S	D-乳酸检测试剂盒(WST-8法)	100次
S0208S	L-乳酸检测试剂盒(WST-8法)	100次
S0211	Amplex Red胆固醇与胆固醇酯检测试剂盒	100次/500次
S0215	Amplex Red游离脂肪酸检测试剂盒	100次/500次
S0219	Amplex Red甘油三酯检测试剂盒	100次/500次
S0223	Amplex Red甘油检测试剂盒	100次/500次
S0227S	Amplex Red L-乳酸检测试剂盒	100次
S0231S	Amplex Red尿酸与尿酸酶检测试剂盒	100次
S0235S	Amplex Red磷酸盐检测试剂盒	100次
S0239S	Amplex Red乙醇检测试剂盒	100次
S0240	乙醇检测试剂盒(WST-8法)	100次/500次

S0241	乙醇脱氢酶活性检测试剂盒(WST-8法)	100次/500次
S0243	Amplex Red黄嘌呤/次黄嘌呤检测试剂盒	100次/500次
S0247S	Amplex Red谷氨酸与谷氨酸氧化酶检测试剂盒	100次
S0251S	Amplex Red过氧化氢与过氧化物酶检测试剂盒	100次
S0255S	Amplex Red过氧化氢酶检测试剂盒	100次
S0259S	Amplex Red单胺氧化酶检测试剂盒	100次
S0263S	Amplex Red鞘磷脂酶检测试剂盒	100次
S0267S	Amplex Red胆碱与乙酰胆碱检测试剂盒	100次
S0271S	Amplex Red乙酰胆碱酯酶检测试剂盒	100次
S0275S	Amplex Red磷脂酰胆碱检测试剂盒	100次
S0279S	Amplex Red磷脂酶D检测试剂盒	100次
S0283S	Amplex Red肌酸检测试剂盒	100次
S0287S	Amplex Red肌酸激酶检测试剂盒	100次
S0291S	Amplex Red肌酐检测试剂盒	100次
S0295S	Amplex Red肌氨酸检测试剂盒	100次
S0299S	Amplex Red丙酮酸检测试剂盒	100次
S0303S	Amplex Red丙酮酸激酶检测试剂盒	100次
S0307S	Amplex Red ADP检测试剂盒	100次
S0311S	Amplex Red磷酸烯醇式丙酮酸检测试剂盒	100次
S0315S	Amplex Red丙氨酸检测试剂盒	100次
S0319S	Amplex Red丙氨酸转氨酶检测试剂盒	100次
S0323S	Amplex Red $\alpha$ -酮戊二酸检测试剂盒	100次
S0327S	Amplex Red天冬氨酸检测试剂盒	100次
S0331S	Amplex Red天冬氨酸氨基转移酶检测试剂盒	100次
S0335S	Amplex Red柠檬酸检测试剂盒	100次
S0339S	Amplex Red草酰乙酸检测试剂盒	100次
S0343S	Amplex Red葡萄糖检测试剂盒	100次
S0347S	Amplex Red葡萄糖氧化酶检测试剂盒	100次
S0351S	Amplex Red果糖检测试剂盒	100次
S0355S	Amplex Red乳糖检测试剂盒	100次
S0359S	Amplex Red半乳糖与乳糖检测试剂盒	100次
S0363S	Amplex Red半乳糖与半乳糖氧化酶检测试剂盒	100次
S0367S	Amplex Red麦芽糖检测试剂盒	100次
S0371S	Amplex Red麦芽糖与葡萄糖检测试剂盒	100次
S0375S	Amplex Red糖原检测试剂盒	100次
S0379S	Amplex Red磷酸果糖激酶检测试剂盒	100次
S0383S	Amplex Red乙酰辅酶A检测试剂盒	100次
S0387S	Amplex Red辅酶A检测试剂盒	100次
S0391S	Amplex Red乙酰辅酶A合成酶检测试剂盒	100次
S0511S	L-苹果酸检测试剂盒(WST-8法)	100次
S0514S	苹果酸脱氢酶活性检测试剂盒(WST-8法)	100次
S0517S	延胡索酸检测试剂盒(WST-8法)	100次
S0520S	延胡索酸酶活性检测试剂盒(WST-8法)	100次
S0523S	异柠檬酸检测试剂盒(WST-8法)	100次
S0526S	异柠檬酸脱氢酶活性检测试剂盒(WST-8法)	100次
S0529S	Amplex Red琥珀酸检测试剂盒	100次
S0530S	琥珀酸脱氢酶活性检测试剂盒(显色法)	100次
S0532S	Amplex Red琥珀酰辅酶A合成酶检测试剂盒	100次
S0535S	支链氨基酸检测试剂盒(WST-8法)	100次
S0538S	N-乙酰氨基葡萄糖苷酶活性检测试剂盒(显色法)	100次
S0540S	酪氨酸检测试剂盒(显色法)	100次
S0542S	酪氨酸酶活性检测试剂盒(显色法)	100次

S0545S	酪氨酸酶抑制剂筛选试剂盒(显色法)	100次
S0547S	髓过氧化物酶活性检测试剂盒(显色法)	100次
S0548S	Amplex Red髓过氧化物酶活性检测试剂盒	100次
S0550S	Amplex Red髓过氧化物酶抑制剂筛选试剂盒	100次
S0554	葡萄糖摄取检测试剂盒(WST-8法)	100次/500次
S0556	葡萄糖摄取检测试剂盒(DTNB法)	100次/500次
S0561	葡萄糖摄取荧光检测试剂盒(2-NBDG)	10-100次/50-500次
S0565S	乙醛检测试剂盒(WST-8法)	100次
S0568S	乙醛脱氢酶活性检测试剂盒(WST-8法)	100次
S0571S	多酚含量检测试剂盒(显色法)	100次
S0574S	尿素检测试剂盒(显色法)	100次
S0577S	尿素酶活性检测试剂盒(显色法)	100次
P0321	碱性磷酸酶检测试剂盒	100次/500次
P0322	碱性磷酸酶检测试剂盒(荧光法)	100次/500次
P0326	酸性磷酸酶检测试剂盒	120次
P0327S	酸性磷酸酶检测试剂盒(荧光法)	100次
P0329	胎盘碱性磷酸酶检测试剂盒	100次
P0332	抗酒石酸酸性磷酸酶检测试剂盒	120次
P0335	抗氟离子酸性磷酸酶检测试剂盒	120次
P0392S	D-乳酸脱氢酶检测试剂盒(WST-8法)	100次
P0393S	L-乳酸脱氢酶检测试剂盒(WST-8法)	100次
P0395S	总乳酸脱氢酶检测试剂盒(WST-8法)	100次
P0405S	$\alpha$ -淀粉酶活性检测试剂盒(显色法)	100次
P0407S	糖化酶活性检测试剂盒(显色法)	100次
P0421S	细胞色素C氧化酶活性检测试剂盒(显色法)	100次

Version 2024.11.18