碧云天生物技术/Beyotime Biotechnology
订货热线: 400-1683301或800-8283301
订货e-mail: order@beyotime.com
技术咨询: info@beyotime.com
网址: http://www.beyotime.com

碧云天网站 微信公众号

G6P检测试剂盒(WST-8法)

产品编号	产品名称	包装
S0185	G6P检测试剂盒(WST-8法)	100次

产品简介：

- 碧云天的G6P检测试剂盒(WST-8法) (G6P Assay Kit with WST-8)是一种高灵敏度的基于WST-8的显色反应，通过比色法来检测细胞、组织或其它样品中G6P含量的检测试剂盒。
- WST-8是MTT的一种升级替代产品，和MTT或其他MTT类似产品如XTT、MTS等相比有明显的优点。首先，MTT被一些脱氢酶还原生成的formazan不是水溶性的，需要有特定的溶解液来溶解；而WST-8和XTT、MTS产生的formazan都是水溶性的，可以省去后续的溶解步骤。其次，WST-8产生的formazan比XTT和MTS产生的formazan更易溶解。再次，WST-8比XTT和MTS更加稳定，使实验结果更加稳定。另外，WST-8和MTT、XTT等相比，线性范围更宽，灵敏度更高。WST-8和WST-1相比，检测灵敏度更高，更易溶解，并且更加稳定。
- **本试剂盒使用便捷**。使用细胞、组织等的裂解液即可进行检测，无需分离纯化细胞、组织或其它样品中的G6P。
- **本试剂盒检测灵敏度高，线性范围宽**。可以检测含量低至20μM (1nmol)的G6P，在20μM (1nmol)至500μM (25nmol)之间呈现良好的线性关系。
- G6P (Glucose-6-phosphate，葡萄糖-6-磷酸，又称6-磷酸葡萄糖)是葡萄糖的第6位碳上的羟基在己糖激酶催化下发生磷酸化后生成的分子，是细胞中常见的糖代谢小分子，参与糖酵解(glycolytic pathway)和磷酸戊糖(pentose phosphate pathway)等生化途径。在糖酵解的第一步反应中，葡萄糖被己糖激酶催化生成葡萄糖-6-磷酸，然后通过磷酸葡萄糖异构酶的催化形成果糖-6-磷酸，以继续糖酵解的其它步骤；而在戊糖磷酸途径中，葡萄糖-6-磷酸是其第一个底物，该过程也是生成NADPH的主要途径。除了这两个代谢途径外，葡萄糖-6-磷酸也能转化形成糖原或淀粉而被存储起来。
- 本试剂盒可检测样品中的G6P含量，具体原理如下：葡萄糖-6-磷酸(G6P)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1-mPMS (1-Methoxy-5-methylphenazinium Methyl Sulfate)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与样品中总的G6P的量呈正比关系。WST-8法检测G6P的原理参考图1。

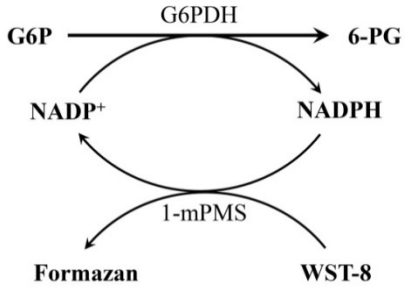

图1. WST-8法检测G6P的原理图。

- 本试剂盒适用于检测细胞、组织以及其它适当样品中G6P的含量。
- 本试剂盒可以测定100个样品。

包装清单：

产品编号	产品名称	包装
S0185-1	酶混合液	220μl
S0185-2	G6P标准品(10mM)	100μl
S0185-3	显色液	220μl
S0185-4	反应缓冲液	5.5ml
S0185-5	G6P提取液	50ml
—	说明书	1份

保存条件：

-20°C保存，一年有效。显色液(S0185-3)须-20°C避光保存。

注意事项：

- 经检测本试剂盒中的酶混合液室温存放72小时或反复冻融5次不影响其酶活性。
- 由于G6P提取液略显粘稠，以该提取液作为稀释液时，无论对标准品还是样品进行稀释，在稀释过程中务必确保稀释均匀，否则易造成实验数据产生较大波动。
- 在样品加样和混匀过程中，须尽量避免产生气泡，以免影响最终的吸光度测定。
- 如果不能非常严格地控制反应温度和反应时间，每次检测都需要设置标准曲线。
- 如果样品溶液中G6P浓度过高或过低，不在试剂盒的线性检测范围内时，可适当调整样品或者提取液的用量。
- 尽量使用新鲜样品进行检测，冻存或反复冻融的细胞或组织样品可能对结果有一定影响。
- 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：

a．G6P提取液室温或37°C水浴解冻，解冻后置于冰浴。如果37°C水浴解冻，须注意解冻后立即置于冰浴。

b．细胞样品的准备：对于贴壁细胞，约1×10^6个细胞(大约相当于6孔板一个孔长满的细胞数量)，吸净培养液，用移液器加入200μl的冰浴预冷的G6P提取液，并轻轻吹打，以促进细胞的裂解；对于悬浮细胞，收集约1×10^6个细胞，600g离心5分钟，吸净培养液，用移液器加入200μl冰浴预冷的G6P提取液，并轻轻吹打，以促进细胞的裂解。裂解过程宜尽量在冰上操作。随后12,000g，4°C离心5-10分钟，取上清作为待测样品，冰浴存放备用。

c．组织样品的准备：冰浴预冷的PBS洗涤组织后，称取约10-50mg的组织样品，用剪刀剪碎，置于匀浆器中，加入400μl的冰浴预冷的G6P提取液在冰上或室温进行匀浆。随后12,000g，4°C离心5-10分钟，取上清作为待测样品，冰浴存放备用。注：匀浆过程在冰上或室温操作均可，但以冰浴操作为佳，可以有效减少内源性G6P水平的下降。

d．液体样品可以直接进行检测。

注意：如果样品中存在能转变或消耗G6P的酶，在检测前需使用10kDa超滤管去掉蛋白质以避免酶的影响。

2．试剂盒的准备工作：

a．G6P标准溶液的制备：把10mM的G6P标准品用G6P提取液稀释成适当的浓度梯度。如初次检测可以设置0、31.25、62.5、125、250、500μM这几个浓度，检测时96孔板每孔加入50μl的标准品，相当于每孔加入的G6P的量为0、1.56、3.125、6.25、12.5、25nmol。如有必要，在后续的实验中可以根据样品中的G6P含量对标准品的浓度范围进行适当调整。其中浓度为0μM的点为空白对照点(Blank)，仅含G6P提取液。

b．G6P检测液的配制：样品中的NADPH等可能会产生一定的背景，建议设置加入样品而不加入酶混合液的背景对照；对于标准品和样品的G6P检测液，需要加入酶混合液。每个背景对照、标准品或样品的检测需要使用50μl的G6P检测液，请根据所需检测的背景对照、标准品和样品的数量，配制适量的G6P检测液，并注意现配现用。G6P检测液的配制方法如下(显色液和酶混合液使用前须适当混匀)：

	G6P检测液(背景对照)	G6P检测液(标准品或样品)
反应缓冲液	48μl	46μl
显色液	2μl	2μl
酶混合液	—	2μl

3．样品测定：

a．样品中G6P含量的测定：吸取50μl待测样品至96孔板中，为了减少实验建议设置样品的重复孔。后续如果发现样品中的G6P含量过高，超出标准品的标准曲线的范围，则需要用G6P提取液将样品适当稀释后再进行检测；含量过低时则需要加大细胞或组织样品的用量。

b．每孔加入50μl G6P检测液，用移液枪轻轻吹打均匀。在加入G6P检测液的过程中须轻柔操作，以免产生气泡。若不慎出现气泡，可使用细小的吸头或针头戳破。背景对照孔需要加入50μl不含G6P底物的G6P检测工作液。**特别注意：**如果样品中的NADPH等产生的背景比较高，就必须设置背景对照；初次检测宜设置背景对照。

c．37°C避光孵育10分钟，此时会形成橙黄色的formazan。测量450nm处的吸光度，如果显色较浅，也可以适当延长孵育时间至15-30分钟，随着孵育时间的延长显色会越来越深。

4．样品中G6P含量的计算：

a．将标准品和样品的吸光度减去标准品浓度为0μM的空白对照(Blank)吸光度。同时，如果背景对照(Background)的吸光度比较高，需要再将所有样品的吸光度减去各自的背景对照的吸光度。

b．以G6P浓度为横坐标，吸光度为纵坐标，绘制出标准曲线。G6P标准品的检测效果请参考图2。

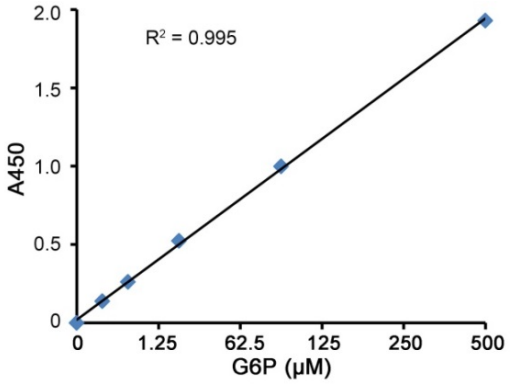

图2. 本试剂盒检测G6P的标准曲线。图中的反应时间为30分钟。不同的检测条件下，实际读数会因标准品的配制、检测仪器等的不同而存在差异，图中数据仅供参考。

c. 根据标准曲线计算细胞、组织等样品中的G6P浓度。
备注：根据检测得到的浓度及样品的体积，即可计算出G6P的量。

d. 如果希望更加精确地来表述G6P的量，可以将样品用BCA法测定蛋白浓度。最终用单位蛋白量中G6P的量来比较精确地进行表述。

使用本产品的文献：

1. Ruiling Liu, Cuilian Liu, Xiaozhen He, Peng Sun, Bin Zhang, Haoran Yang, Weiyun Shi, Qingguo Ruan . MicroRNA-21 promotes pancreatic β cell function through modulating glucose uptake Nat Commun. 2022 Jun 21;13(1):3545.
2. Guangsong Xu, Mingliang Li, Jiang Wu, Chunhong Qin, Yin Tao, Hongjie He . Circular RNA circNRIP1 Sponges microRNA-138-5p to Maintain Hypoxia-Induced Resistance to 5-Fluorouracil Through HIF-1α-Dependent Glucose Metabolism in Gastric Carcinoma Cancer Manag Res. 2020 Apr 23;12:2789-2802.
3. Jian Luo, Qiang He, Jin-Zhi Xu, Chen Xu, Yin-Ze Han, Hai-Long Gao, Xian-Zhi Meng, Guo-Qing Pan, Tian Li, Ze-Yang Zhou . Microsporidia infection upregulates host energy metabolism but maintains ATP homeostasis J Invertebr Pathol. 2021 Nov;186:107596.
4. Hongwu Huang, Zhenzhen Liu, Xiaoru Qi, Nailong Gao, Jianguo Chang, Miaomiao Yang, Sha Na, Yanyan Liu, Rui Song, Lu Li, Guangliang Chen, Hui Zhou . Rhubarb granule promotes diethylnitrosamine-induced liver tumorigenesis by activating the oxidative branch of pentose phosphate pathway via G6PD in rats J Ethnopharmacol. 2021 Dec 5;281:114479.

Version 2024.03.12