

葡萄糖摄取检测试剂盒(WST-8法)

产品编号	产品名称	包装
S0554S	葡萄糖摄取检测试剂盒(WST-8法)	100次
S0554M	葡萄糖摄取检测试剂盒(WST-8法)	500次

产品简介:

- 碧云天的葡萄糖摄取检测试剂盒(WST-8法) (Glucose Uptake Assay Kit with WST-8), 又称葡萄糖摄入检测试剂盒(WST-8法)或WST-8法葡萄糖摄入检测试剂盒, 是一种基于WST-8的显色反应, 利用葡萄糖类似物D-2-脱氧葡萄糖的摄入和基于WST-8显色的生化方法, 通过吸光度检测, 简单、快速、高灵敏地用于细胞或组织葡萄糖摄取能力检测的试剂盒。
- 葡萄糖是生物体重要的能量来源和代谢中间产物。葡萄糖一方面也是光合作用的主要产物, 另一方面也是呼吸反应的主要底物。在呼吸反应中, 葡萄糖通过一系列的酶促反应氧化生成二氧化碳和水, 同时产生重要的能量分子ATP。葡萄糖代谢是将葡萄糖转化为能量的过程, 是大多数生物体能量供应的主要来源, 在细胞代谢和体内稳态维持中起着关键作用[1-3]。细胞摄取葡萄糖是一个重要的生理过程, 其摄取能力的检测对于理解细胞生理、病理和治疗相关疾病具有重要意义。在生理与代谢研究领域, 检测细胞摄取葡萄糖对于理解细胞的糖代谢和能量代谢具有重要价值; 在糖尿病研究领域, 检测细胞摄取葡萄糖能力常用于解析高血糖的原因以及评估胰岛素敏感性和胰岛素抵抗; 在肿瘤研究领域, 许多肿瘤细胞表现出异常的葡萄糖摄取, 通过监测细胞摄取葡萄糖的变化, 可以更好地了解肿瘤细胞糖代谢的异常情况, 为肿瘤防治提供线索[4-6]。
- 本试剂盒的检测原理请参考图1。葡萄糖类似物D-2-脱氧葡萄糖(2-Deoxy-D-glucose, 2-DG), 与D-葡萄糖(D-glucose)结构相似, 可被葡萄糖转运体摄取到细胞中, 并被内源性己糖激酶(Hexokinase)代谢成2-脱氧-D-葡萄糖-6-磷酸(2-Deoxy-D-Glucose-6-phosphate, 2-DG6P)。由于2-DG6P不是磷酸葡萄糖异构酶的底物, 无法异构化为果糖, 导致糖酵解反应中断, 2-DG6P在细胞内蓄积, 与细胞的葡萄糖摄取水平成正比[7]。葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(Glucose-6-phosphate dehydrogenase, G6PDH)可催化细胞中积累的2-DG6P转化为2-脱氧-6-磷酸葡萄糖酸酯(6PDG) [8], 同时NADP⁺转化为NADPH, 生成的NADPH在电子耦合剂(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。通过检测反应体系中生成的Formazan的吸光度以最终计算样品中2-DG6P的含量, 进而间接反映2-DG的含量, 从而检测出细胞对葡萄糖的摄取能力。

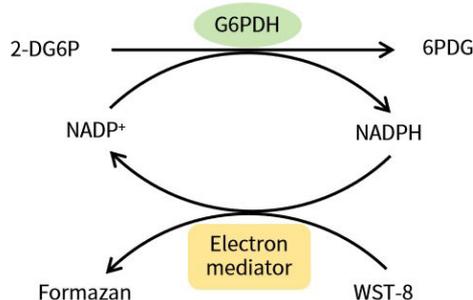


图1. 碧云天葡萄糖摄取检测试剂盒(WST-8法) (S0554)检测原理图。

- 本试剂盒检测灵敏度较高, 线性范围宽, 样品用量少。本试剂盒在样品体积为50 μ l时可以检测样品中浓度低至1 μ M 2-DG的摄入, 在1-500 μ M (0.05-25nmol)浓度范围内有良好的线性关系。本试剂盒提供了2-DG代谢产物2-DG6P标准溶液, 可以通过设置标准曲线(图2A), 从而计算出2-DG摄入量, 即间接反映葡萄糖的摄取水平(图2B)。如果需要进行葡萄糖摄入能力的高精度检测, 或者样品量较少或者样品的葡萄糖摄取能力较低, 可以使用检测灵敏度更高的葡萄糖摄取检测试剂盒(DTNB法) (S0556)。

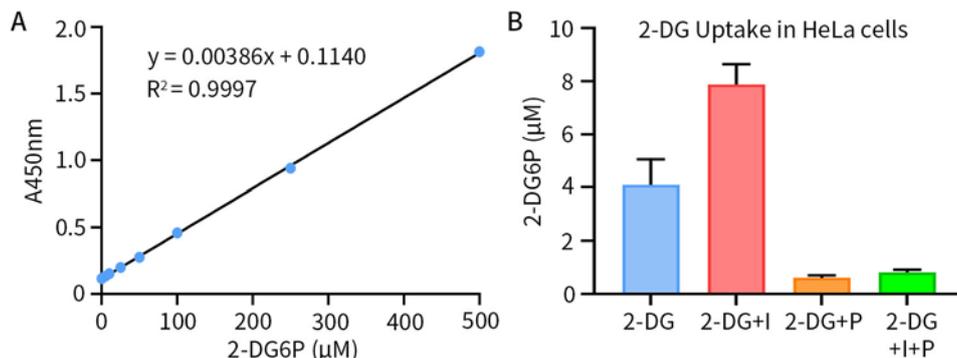


图2. 碧云天葡萄糖摄取检测试剂盒(WST-8法) (S0554)对于2-DG6P标准品和HeLa细胞样品的检测效果。图A为本试剂盒对标准

品2-DG6P的检测效果。50 μ l不同浓度的2-DG6P标准品(用Glucose Uptake Assay Buffer稀释), 与50 μ l Glucose Uptake Detection反应工作液混匀后, 37 $^{\circ}$ C避光孵育30分钟, 测定A₄₅₀, 在1-500 μ M (0.05-25nmol)浓度范围内有良好的线性关系。图B为本试剂盒对油酸诱导后的HeLa细胞葡萄糖摄取能力的检测效果图。油酸诱导后的96孔板培养的HeLa细胞经无血清低糖培养液孵育过夜后, 用KRPB Buffer孵育40分钟, 再如图所示使用胰岛素(Insulin)或/和根皮素(Phloretin)进行预处理, 再加入2-DG进行孵育, 适当洗涤后最终用100 μ l Glucose Uptake Lysis Buffer裂解制备细胞样品, 取50 μ l裂解液, 与50 μ l Glucose Uptake Detection反应工作液混匀后, 37 $^{\circ}$ C避光孵育30分钟, 测定A₄₅₀。I, Insulin, 用于增强葡萄糖摄入; P, Phloretin, 用于抑制葡萄糖摄取。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。

- **本试剂盒使用便捷, 检测速度快。**相较于碧云天的同类产品葡萄糖摄取检测试剂盒(DTNB法) (S0556), 本试剂盒的使用更加便捷, 检测速度更快。仅需将配制好的Glucose Uptake Detection反应工作液和样品等体积混合后于37 $^{\circ}$ C孵育30分钟, 即可直接进行吸光度检测, 无需其它任何处理。但本试剂盒的检测灵敏度比葡萄糖摄取检测试剂盒(DTNB法) (S0556)低约40倍。
- **本试剂盒应用范围广。**本试剂盒可用于不同细胞组织样品的检测, 不区分物种; 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孔板检测细胞样品时或自备2-DG用于动物的组织样品检测时, 本试剂盒小包装可以进行100次检测, 中包装可以进行500次检测。

包装清单:

产品编号	产品名称	包装
S0554S-1	Glucose Uptake Lysis Buffer	15ml
S0554S-2	Glucose Uptake Assay Buffer	10ml
S0554S-3	KRPB Buffer	12ml
S0554S-4	Glucose Uptake Reagent A	200 μ l
S0554S-5	Glucose Uptake Reagent B	100 μ l
S0554S-6	Enzyme Solution	100 μ l
S0554S-7	2-DG (10mM)	1ml
S0554S-8	2-DG6P Standard (10mM)	50 μ l
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
S0554M-1	Glucose Uptake Lysis Buffer	70ml
S0554M-2	Glucose Uptake Assay Buffer	50ml
S0554M-3	KRPB Buffer	60ml
S0554M-4	Glucose Uptake Reagent A	1ml
S0554M-5	Glucose Uptake Reagent B	500 μ l
S0554M-6	Enzyme Solution	500 μ l
S0554M-7	2-DG (10mM)	5ml
S0554M-8	2-DG6P Standard (10mM)	250 μ l
—	说明书	1份

保存条件:

-20 $^{\circ}$ C保存, 一年有效。其中Glucose Uptake Reagent A须避光保存。

注意事项:

- 如拟进行活体动物特定组织的葡萄糖摄取检测, 需要自备适量的2-脱氧葡萄糖(2-DG), 试剂盒中提供的2-DG仅能满足细胞实验的需要。推荐选购D-2-脱氧葡萄糖(\geq 99%, Reagent grade) (ST1024)。
- 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. 试剂盒的准备。

- a. 融解Glucose Uptake Assay Buffer、Glucose Uptake Lysis Buffer、KRPB Buffer和2-DG (10mM), 平衡至室温后混匀备用。Glucose Uptake Reagent A、Glucose Uptake Reagent B和Enzyme Solution于融解后放置于冰浴备用, 使用完毕后宜立即按照试剂盒要求的条件保存。
- b. Glucose Uptake Detection反应工作液(Working Solution)的配制: 按照每个反应50 μ l的体积配制适量的Glucose Uptake Detection反应工作液。均匀混合46 μ l Glucose Uptake Assay Buffer、2 μ l Glucose Uptake Reagent A、1 μ l Glucose Uptake Reagent B、1 μ l Enzyme Solution, 即可配制成50 μ l Glucose Uptake Detection反应工作液。根据待检测样品(包括标准品)的数量, 配制适量的Glucose Uptake Detection反应工作液。具体配制方法参考下表。配制好的Glucose Uptake

Detection反应工作液如果置于4°C或冰浴避光保存，可以在当天数小时内使用，但建议尽量现配现用。

Samples	1	10	20	50
Glucose Uptake Assay Buffer (μl)	46	460	920	2300
Glucose Uptake Reagent A (μl)	2	20	40	100
Glucose Uptake Reagent B (μl)	1	10	20	50
Enzyme Solution (μl)	1	10	20	50
Working Solution (μl)	50	500	1000	2500

注：由于Glucose Uptake Reagent A、Glucose Uptake Reagent B和Enzyme Solution的用量较少且易沉降，必须注意在加入后须适当混匀后再使用。

2. 细胞样品的准备(以96孔板为例)。

本实验方案针对油酸诱导的HeLa细胞进行举例说明，油酸诱导方案仅供参考。对于其它类型的细胞如分化的3T3-L1脂肪细胞、肌肉细胞、肝脏细胞等，最佳孵育时间和处理方案可能会有所不同。

- 接种细胞。按照每孔1万个细胞量加入96孔板中，培养箱继续培养24小时。
- 油酸诱导HeLa细胞。PBS洗涤细胞1次，每孔加入100μl含有800μM油酸的完全培养液，培养箱继续培养24小时。推荐使用油酸(≥99%, Cell Culture Grade) (ST2053)。
- PBS洗涤细胞2次，每孔加入100μl无血清低糖培养液，培养过夜。

注1：也可使用无糖培养液，使用无糖培养液处理不应超过6个小时，以避免造成细胞损伤。推荐碧云天的低糖或无糖DMEM培养液(C2712/C2715)或无糖RPMI 1640培养液(C2727)。

注2：对于分化的3T3-L1脂肪细胞等，仅需要无血清培养液饥饿处理即可。无血清培养时间可根据实际细胞状态进行调整。

- 次日，PBS洗涤细胞3次。每孔加入100μl KRPH Buffer，37°C孵育40分钟，使细胞进一步缺乏葡萄糖。
注：步骤2a-2d仅供参考，对于具体拟检测的细胞样品，可以任意自行设置。
- 对照和样品组的设置。

(a) 背景对照组。无需进行胰岛素或根皮素等处理，也无须加入2-DG。

注：必须设置背景对照组，以消除细胞内源性G6P、NADP⁺等的干扰。

(b) (选做)阳性和阴性对照组。加入胰岛素至合适的终浓度(如100μg/ml)作为阳性对照，或加入抑制剂(如终浓度为150μM的根皮素)作为阴性对照，孵育20分钟。随后加入10μl 2-DG (10mM)，孵育20分钟。

注1：加入胰岛素可刺激细胞快速摄取葡萄糖。

注2：产生胰岛素耐受的细胞在添加胰岛素刺激后，细胞的葡萄糖摄取能力会减弱。

(c) 样品组。目的药物等处理适当时间后，加入10μl 2-DG (10mM)，孵育20分钟。

注：对于一些葡萄糖摄入比较缓慢的细胞，阳性和阴性对照组以及样品组加入2-DG后的孵育时间可以延长到例如60分钟，同时也可以考虑把2-DG的加入量加倍，即可以考虑加入20μl 2-DG (10mM)。通过上述两种操作可以提高葡萄糖摄取的检测灵敏度。

- 使用PBS洗涤细胞3次，每孔加入100μl Glucose Uptake Lysis Buffer，适当吹打，充分裂解细胞。4°C，14,000×g离心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，制备好的细胞裂解液样品如果不能立即检测，可以短期保存于-20°C或-80°C。推荐碧云天的BeyoFuge™ 1524R高速台式冷冻离心机(15000rpm, 24孔) (E6943)。

3. 组织样品的准备。

- 实验动物处理和2-DG摄入。小鼠等实验动物进行适当的药物处理或遗传操作后注射或灌胃适量的2-DG，同时必须设置未注射或灌胃2-DG的背景对照组。同时推荐设置适当的阴性和阳性对照。推荐注射或灌胃等摩尔数的葡萄糖后不会显著影响血糖水平为宜，这样外源进入体内的2-DG对于体内正常的糖代谢干扰较小。
- 组织样品采集。根据具体的实验设计，可以酌情考虑在注射或灌胃2-DG例如30分钟、60分钟或120分钟后采集目的组织样品，同时采集背景对照组的组织样品。
- 组织样品的制备。使用Glucose Uptake Lysis Buffer按照1:10的比例(10mg组织样品使用100μl Glucose Uptake Lysis Buffer)进行匀浆和裂解，随后4°C，14,000×g离心5分钟，取上清用于后续检测。推荐碧云天的BeyoFuge™ 1524R高速台式冷冻离心机(15000rpm, 24孔) (E6943)。

4. 样品测定。

- 2-DG6P标准曲线设置：取10μl 2-DG6P Standard (10mM)，加入190μl Glucose Uptake Assay Buffer，混匀，配制成浓度为500μM的2-DG6P标准溶液。分别取500μM的2-DG6P标准溶液0、0.5、1、2.5、5、10、25、50μl加入96孔板的标准品孔中，并相应地用Glucose Uptake Assay Buffer补足至50μl，此时，标准曲线的浓度分别为0、5、10、25、50、100、250、500μM。
- 取1-50μl样品或稀释后的样品至96孔板样品孔中，并相应地加入Glucose Uptake Assay Buffer至样品孔中，补足至50μl。
注：为确保样品数值在标准曲线范围内，建议进行预实验将样品设置多个稀释倍数，以确定样品中2-DG6P的大致浓度，如果数值不在标准曲线范围内，请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20μl，则n=10×50/20=25)。
- 每孔加入50μl Glucose Uptake Detection反应工作液，混匀，37°C避光反应30分钟。
注：如果吸光度偏低，可适当延长反应时间，例如反应45或60分钟。
- 反应结束后，请在450nm处进行吸光度检测。

- e. 建立标准曲线, 并计算样品中2-DG6P的浓度(A), 如果样品的背景对照信号比较高, 样品的信号值应减去样品背景对照的信号值。2-DG6P标准曲线可以参考图2A, 在1-500 μ M浓度范围内有良好的线性关系。2-DG摄取计算公式如下:

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

注: A为步骤3e根据标准曲线确定的2-DG6P浓度(μ M);

n为步骤3b样品总稀释倍数。

参考文献:

1. Scoditti E, Sabatini S, Carli F, Gastaldelli A. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2024. 21(5):319-334.
2. Jones JG. Diabetologia. 2016. 59(6):1098-103.
3. Bose S, Le A. Glucose Metabolism in Cancer. Adv Exp Med Biol. 2018. 1063:3-12.
4. Walker-Samuel S, Ramasawmy R, Torrealdea F, Rega M, et al. Nat Med. 2013. 19(8):1067-72.
5. Hay N. Nat Rev Cancer. 2016. 16(10):635-49.
6. Sylo L, Kleinert M, Richter EA, Jensen TE. Nat Rev Endocrinol. 2017. 13(3):133-148.
7. Yamamoto N, Sato T, Kawasaki K, Murosaki S, Yamamoto Y. Anal Biochem. 2006. 351(1):139-45.
8. Yamamoto N, Ashida H. Food Sci Technol Res. 2012. 18:498-503.

相关产品:

产品编号	产品名称	包装
ST1024	D-2-脱氧葡萄糖($\geq 99\%$, Reagent grade)	250mg/1g/5g
ST1228	D-(+)-葡萄糖($\geq 99.5\%$, BioReagent)	250g/1kg/6 \times 1kg
ST2078	2-NBDG ($\geq 98\%$, BioReagent)	5mg/20mg/100mg
ST2082	2-DG6P ($\geq 98\%$, BioReagent)	5mg/25mg/100mg
S0185	G6P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
S0202	葡萄糖检测试剂盒(GOD/POD显色法)	100次/500次
S0538S	N-乙酰氨基葡萄糖苷酶活性检测试剂盒(显色法)	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
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

Version 2025.02.06