

果糖-6-磷酸（F6P）含量试剂盒说明书

（微板法 96 样）

一、产品简介：

果糖-6-磷酸(F6P)是糖代谢和糖异生途径的中间产物，广泛地存在于动植物和微生物体中。

本试剂盒提供一种简单，灵敏，快速的测定方法：果糖-6-磷酸（F6P）在磷酸葡萄糖异构酶和磷酸葡萄糖脱氢酶的相继作用下使 NADP⁺还原成 NADPH，通过检测 NADPH 在 340nm 处的增加量即可计算得出样品中的 F6P 含量。

二、试剂盒组成和配制：

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 100mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	粉体 mg×1 支	4℃ 保存	使用前甩几下或离心使试剂落入底部，再加 1.2mL 蒸馏水溶解备用。
试剂二	粉体 mg×1 支	-20℃ 保存	使用前甩几下或离心使试剂落入底部，再加 1.2mL 蒸馏水溶解备用。
试剂三	液体 16mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂四	液体 μL×1 支	-20℃ 保存	使用前甩几下或离心使试剂落入底部，再加 1.1mL 蒸馏水溶解备用。

三、所需的仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、台式离心机、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

四、果糖-6-磷酸（F6P）含量测定：

1、样本制备

① 组织样本：

建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液，进行冰浴匀浆。12000rpm, 4℃ 离心 10min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可以按照组织质量（g）：提取液体积(mL)为 1：5~10 的比例提取。

② 细菌/细胞样本：

先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；取约 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液，超声波破碎细菌或细胞（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，可按照细菌/细胞数量（10⁴）：提取液（mL）为 500~1000：1 的比例进行提取。

③ 液体样本：直接检测。

2、上机检测：

① 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 340nm。

② 试剂解冻至室温（25℃）；

③ 在 96 孔板中按照下表依次加入试剂：

试剂名称（μL）	测定管	空白管（仅做一次）
试剂一	10	10
试剂二	10	10
试剂三	150	170
样本	20	
混匀，于室温（25℃）下孵育 20min 后于 340nm 处读取 A1（若 A		

值继续增加，需延长孵育时间，直至 2 分钟内吸光值不变）。		
试剂四	10	10
混匀，于室温（25℃）下孵育 20min 后于 340nm 处读取 A2（若 A 值继续增加，需延长孵育时间，直至 2 分钟内吸光值不变）， $\Delta A = (A2 - A1) \text{ 测定} - (A2 - A1) \text{ 空白}$ 。		

【注】若 ΔA 的差值在零附近徘徊，可增加样本量 $V1$ （如增至 100 μ L，则试剂三相应减少，保持总体积不变），或增加样本取样质量 W ，则改变后的 $V1$ 和 W 需代入公式重新计算。

五、结果计算：

1、按样本重量计算：

$$\text{F6P 含量}(\mu\text{g/g 鲜重}) = [(\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^6 \times Mr) \div (W \times V1 \div V) \times D = 836 \times \Delta A \div W \times D]$$

2、按细胞数量计算：

$$\text{F6P 含量}(\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^6 \times Mr) \div (500 \times V1 \div V) \times D = 1.7 \times \Delta A \times D]$$

3、按照液体体积计算：

$$\text{F6P 含量}(\mu\text{g/mL}) = [(\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^6 \times Mr) \div V1 = 836 \times \Delta A]$$

ϵ ---NADH 摩尔消光系数，6.22 $\times 10^3$ L/mol/cm；

d ---96 孔板光径，0.5cm；

V ---加入提取液体积，1 mL；

$V1$ ---加入样本体积，0.02mL；

$V2$ ---反应总体积；0.2mL=2 $\times 10^{-4}$ L；

W ---样本质量，g；

Mr ---果糖-6-磷酸（F6P）分子量；260；

500---细胞数量，百万；

D ---稀释倍数，未稀释即为 1。