

2-NBDG Glucose Uptake Cell-Based Kit

Cat. No: E-CK-A441

Size: 50 Assays/200 Assays

产品编号	产品名称	50 Assays	200 Assays	Storage
E-CK-A441A	2-NBDG Reagent (10 mM)	500 µL	500 µL×4	-20°C, shading light
E-CK-A441B	2-NBDG Uptake Buffer	10 mL	10 mL×4	-20°C, shading light
	说明书		1 份	

保存条件

2-NBDG Reagent (10 mM)和 2-NBDG Uptake Buffer 可在-20°C避光保存 1 年有效。

检测原理

2-NBDG Reagent 是一种绿色荧光标记(Ex/Em=475nm/550nm)的脱氧葡萄糖类似物,是由 D-葡萄糖胺与 NBD-Cl 反应合成的荧光标记的葡萄糖衍生物,它与 D 型葡萄糖具有相同的转运体 (GLUTs) 和类似的转运动力学。2-NBDG Reagent 经细胞摄取后,在 C-6 位置被己糖激酶磷酸化,被代谢成 2-NBDG-6-磷酸(荧光衍生物),从而使细胞发出绿色荧光,荧光强度反应了细胞的葡萄糖摄取量,以此作为探针来测定活细胞的葡萄糖摄取能力,是判断细胞活力的指标之一,也可用于糖代谢疾病药物的评估与筛选。

检测样本类型

- √贴壁细胞
- √悬浮细胞

自备试剂及仪器

1) 试剂

PBS 缓冲液、细胞培养相关试剂

2) 仪器

流式细胞仪、荧光显微镜、生物安全柜、CO₂ 培养箱

3) 耗材

细胞培养皿、24 孔板、细胞爬片、载玻片

For Research Use Only

实验操作指南

➤ 荧光显微镜检测流程

- a) 小心吸除贴壁细胞的培养基，每孔加入 1 mL 的 PBS 缓冲液浸润洗涤细胞 3 min，去除 PBS 缓冲液。
- b) **2-NBDG 染色工作液(500 μM)的配制**：取出冻存的 2-NBDG Reagent (10 mM)和 2-NBDG Uptake Buffer，室温解冻后，涡旋混匀各试剂，按照 96 孔板每孔 100 μL 和 24 孔板每孔 200 μL 的标准，根据具体实验用量参考下表配制足量的染色工作液（**现配现用**）：

组分	2-NBDG 染色工作液(500 μM)			
2-NBDG Reagent (10 mM)	10 μL	25 μL	50 μL	100 μL
2-NBDG Uptake Buffer	200 μL	500 μL	1000 μL	2000 μL

注：每次实验建议设置阴性对照，阴性对照为 2-NBDG Uptake Buffer 重悬，且不加 2-NBDG Reagent 的空白细胞。

- c) 按照 96 孔板每孔 100 μL, 24 孔板每孔 200 μL 的比例加入 2-NBDG 染色工作液(500 μM), 37°C 培养箱避光孵育 60~120 min。

注：不同细胞的糖摄取能力有差异，孵育时间可适当降低或延长。

- d) 小心吸除染色工作液，每孔加入 1 mL 的 PBS 缓冲液，浸洗细胞 3~5 min，去除 PBS 缓冲液，加入 500 μL PBS 缓冲液浸润细胞。
- e) 直接在倒置荧光显微镜下观察并拍照。（2-NBDG 探针为绿色荧光，Ex/Em= 475nm/550nm）。
- f) 若贴壁细胞提前贴附在玻璃爬片上，染色后也可取出细胞爬片，置于载玻片上，再使用正置荧光显微镜进行观察并拍照。

注：细胞爬片取出拍照时需要保持细胞湿润，可选用活细胞适用的抗荧光淬灭封片剂封片后再进行观察。

- g) 若是悬浮细胞，则收集细胞沉淀后，按照 $1\sim5\times 10^5$ 个细胞加入 500 μL 2-NBDG Reagent 染色工作液(500 μM)重悬细胞沉淀，37°C 避光孵育 60 min~120 min，加入 1 mL 的 PBS 缓冲液，300g 离心 5min 洗涤细胞后，去除上清，取 10~20 μL PBS 缓冲液重悬细胞沉淀，滴加在载玻片上，轻轻盖上盖玻片即可在显微镜下观察拍照。

注：染色工作液建议现配现用，当天内使用完毕。

➤ 流式细胞仪检测流程

- a) 收集细胞，室温 300g 离心 3 min，去除上清，加入 5 mL PBS 缓冲液重悬细胞沉淀，室温 300g 离心 3 min，去除上清。

For Research Use Only

- b) **2-NBDG 染色工作液(100 μ M)的配制**: 相较于荧光显微镜, 流式细胞仪检测灵敏度较高, 2-NBDG 染色最佳工作液浓度为 100 μ M; 取出冻存的 2-NBDG Reagent (10 mM) 和 2-NBDG Uptake Buffer, 室温解冻后, 涡旋混匀各试剂, 按照 $1\sim 5\times 10^5$ 个细胞/200 μ L, 根据具体实验用量参考下表配制足量的染色工作液:

组分	2-NBDG 染色工作液 (100 μ M)			
2-NBDG Reagent (10 mM)	2 μ L	5 μ L	10 μ L	20 μ L
2-NBDG Uptake Buffer	200 μ L	500 μ L	1000 μ L	2000 μ L

注: 每次实验建议设置阴性对照, 阴性对照为 2-NBDG Uptake Buffer 重悬, 且不加 2-NBDG Reagent 的空白细胞。

- c) 每组 $1\sim 5\times 10^5$ 个细胞, 加入 200 μ L 2-NBDG 染色工作液 (100 μ M) 重悬细胞沉淀, 轻轻吹打混匀, 37 $^{\circ}$ C 培养箱避光孵育 60 min。
- d) 孵育好的细胞每组加入 1 mL PBS 缓冲液, 轻轻吹打混匀, 室温 300g 离心 3 min, 弃上清。
- e) 每组加入 1 mL PBS 缓冲液重悬细胞沉淀, 轻轻吹打混匀, 室温 300g 离心 3 min, 弃上清。
- f) 每组加入 100~200 μ L PBS 缓冲液重悬细胞沉淀, 流式细胞仪上机检测, 若来不及检测, 建议避光置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱, 1 h 内检测完毕。

注:

- a) 流式细胞仪检测 2-NBDG Reagent, 可使用 FITC 通道;
- b) 若细胞的葡萄糖摄取能力较弱, 可适当延长孵育时间至 120 min。

结果展示

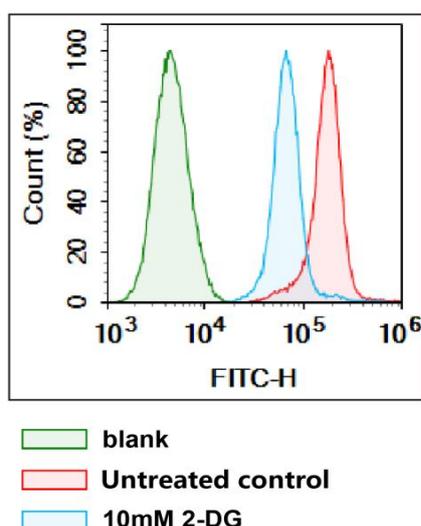


图 1. Jurkat 细胞在加 10 mM 2-DG 或不加 2-DG (Untreated control) 的培养基中孵育培养 60 min, 洗涤后使用 2-NBDG Glucose Uptake Cell-Based Kit 孵育 60 min, 流式细胞仪检测细胞的葡萄糖摄取情况, 加入 2-DG 孵育可抑制 Jurkat 细胞的葡萄糖摄取。

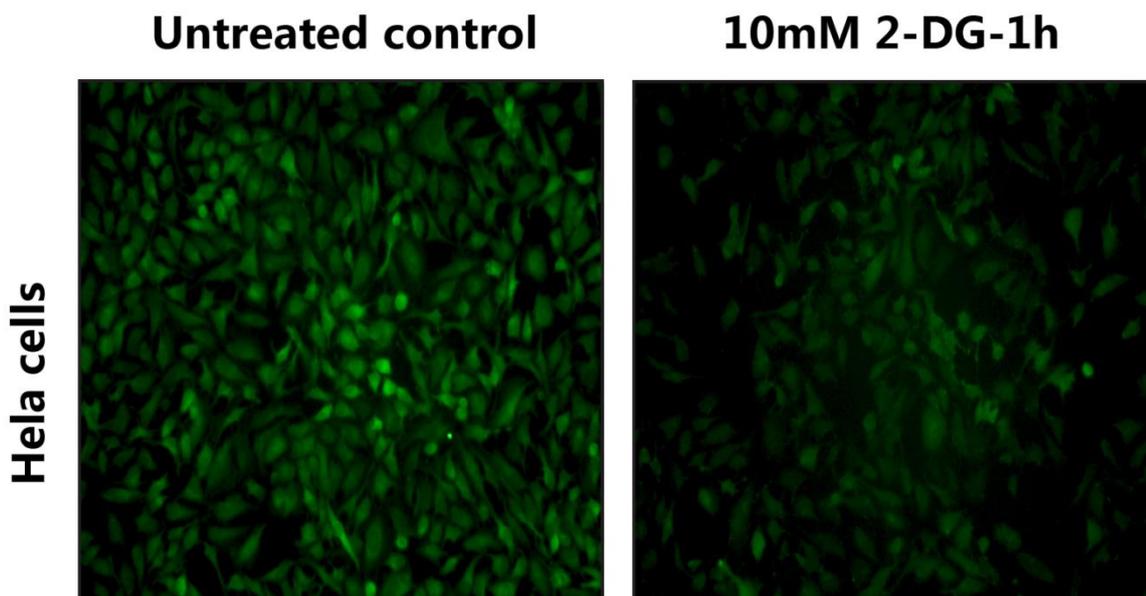


图 2. HeLa 细胞在加(左)或不加 10 mM 2-DG(右)孵育培养 60 min, 洗涤后使用 2-NBDG Glucose Uptake Cell-Based Kit 孵育 60 min, 荧光显微镜检测葡萄糖摄取情况, 加入 2-DG 孵育可抑制 HeLa 细胞的葡萄糖摄取。

注意事项

1. 本产品仅供科研使用。
2. 为了您的安全与健康, 请穿戴实验室工作服和一次性手套进行操作, 并遵守实验室试剂操作规程。
3. 本产品存在荧光猝灭问题, 请-20℃避光保存; 若长期不使用, 请适当分装后-80℃保存。为保证使用效果, 建议尽量在 6 个月内使用完毕。