

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

产品货号：E-BC-F041

产品规格：96T(40 samples)

检测仪器：荧光酶标仪(激发波长：530 nm，发射波长：590 nm)

Elabscience®葡萄糖摄取荧光法试剂盒

Glucose Uptake Fluorometric Assay Kit

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话：400-999-2100

邮箱：biochemical@elabscience.cn

网址：www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。

联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

用途

本试剂盒适用于细胞样本葡萄糖摄取能力测定。

检测原理

2-脱氧葡萄糖被细胞摄入后, 转化为 2-DG-6P, 2-DG-6P 在葡萄糖脱氢酶催化生成 6PDG, 同时 NADP^+ 转换成 NADPH , 生成的 NADPH 在心肌黄递酶的作用下将探针转化成荧光物质, 荧光物质能够在 530 nm 处被激发, 590 nm 处检测发射波长。

提供试剂和物品

编号	名称	规格 (Size)(96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	酸试剂 (Acid Reagent)	10 mL×1 瓶	-20℃ 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	碱试剂 (Alkali Reagent)	10 mL×1 瓶	-20℃ 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	显色剂 (Chromogenic Agent)	25 mL×1 瓶	-20℃ 避光 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	酶试剂 (Enzyme Reagent)	粉剂×2 支	-20℃ 保存 6 个月
试剂五 (Reagent 5)	10 mmol/L 2-脱氧葡萄糖 (10 mmol/L 2-DG)	1.5 mL×1 支	-20℃ 保存 6 个月
试剂六 (Reagent 6)	0.3 nmol/μL 标准品 (0.3 nmol/μL Standard)	2 mL×1 瓶	-20℃ 保存 6 个月
试剂七 (Reagent 7)	KRPH 缓冲液 (KRPH Buffer Solution)	55 mL×1 瓶	-20℃ 保存 6 个月
	96 孔黑色酶标板	1 板	
	96 孔覆膜	2 张	
	样本位置标记表	1 张	

说明: 试剂严格按上表中的保存条件保存, 不同测试盒中的试剂不能混用。

对于体积较少的试剂, 使用前请先离心, 以免量取不到足够量的试剂。

所需自备物品

仪器：荧光酶标仪(激发波长 530 nm，发射波长 590 nm)

试剂准备

① 检测前，试剂盒中试剂平衡至室温。

② 工作液配制：

取一支试剂四用10 mL试剂三溶解，2-8℃可避光保存3天。

③ 不同浓度标准品的稀释：

编号	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
标准品浓度 (nmol/μL)	0	0.06	0.12	0.15	0.18	0.21	0.24	0.3
0.3 nmol/μL 标准品 (μL)	0	40	80	100	120	140	160	200
双蒸水(μL)	200	160	120	100	80	60	40	0

操作步骤

细胞前处理

将细胞接种于 96 孔细胞培养板中，每孔约 2000 个细胞，可根据自己实验需求培养和处理细胞。

摄取过程

- ① 细胞于无血清细胞培养基中饥饿过夜(饥饿细胞)，吸出培养基弃置，200 μL KRPB 溶液(包含 2%BSA)洗涤细胞两次，对照孔与测定孔各加入 100 μL KRPB 溶液(包含 2%BSA)，测定孔加入 10 μL 10 mmol/L 2-DG 于细胞培养板中，对照孔加入 10 μL KRPB 溶液，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min。
 - ② 用 100 μL KRPB 溶液(pH 7.4)洗涤细胞三次，加入 50 μL 试剂一，室温静置 10 min 加入 50 μL 试剂二。
 - ③ 标准孔:取 30 μL 不同浓度标准品,加入荧光酶标板相应的标准孔中。
测定孔: 从步骤②中相应测定孔中取 30 μL 于荧光酶标板中。
对照孔: 从步骤②中相应对照孔中取 30 μL 于荧光酶标板中。
 - ④ 向步骤③各孔中加入 170 μL 工作液。
 - ⑤ 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 30 min。。
 - ⑥ 荧光酶标仪激发波长 530 nm，发射波长 590 nm 检测各孔荧光值。
- 注：移液枪移取液体时，小心吸打，避免产生气泡。**

结果计算

标准品拟合曲线: $y = ax + b$

细胞样本中葡萄糖摄取计算公式:

$$\text{葡萄糖摄取量} = (F_2 - F_1 - b) \div a$$

(nmol/ μ L)

注解:

x: 标准品浓度

y: 标准品荧光值-空白荧光值(标准品浓度为 0 时的荧光值)

a: 标准曲线斜率

b: 标准曲线截距

F₁: 对照孔荧光值(未用 2-DG 孵育的细胞样本)

F₂: 测定孔荧光值(2-DG 孵育的细胞样本)

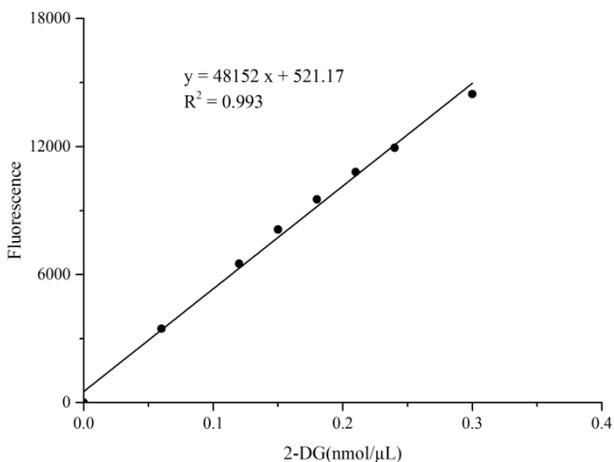
附录1 关键数据

标准曲线(数据仅供参考)

①不同浓度的标准品加样量10 μL ，按照操作步骤进行实验，荧光酶标仪激发波长530 nm，发射波长590 nm检测各孔荧光值，各孔荧光值如下表所示(仅供参考)：

标准品浓度 (nmol/ μL)	0	0.06	0.12	0.15	0.18	0.21	0.24	0.3
荧光值	5176	8677	11778	13332	14730	16049	17242	19704
	5211	8643	11635	13276	14717	15968	17037	19603
平均荧光值	5194	8660	11707	13304	14724	16009	17140	19654
绝对荧光值	0	3467	6513	8111	9530	10815	11946	14460

②绘制标曲(如下图)：



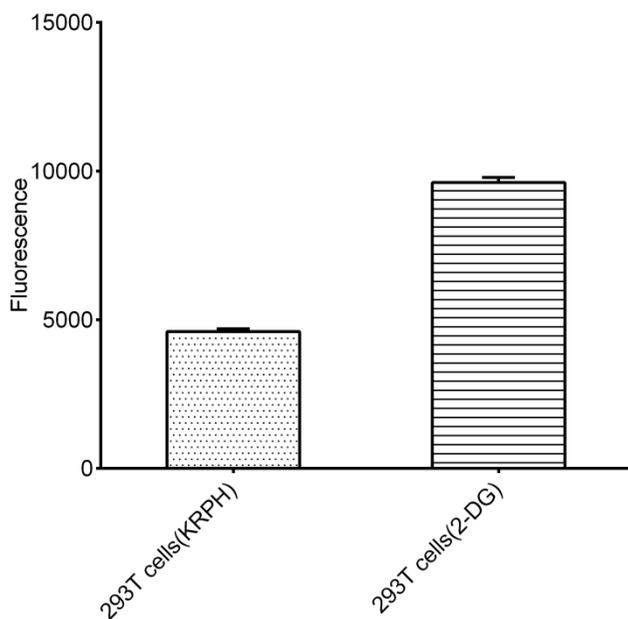
附录2 实例分析

例如检测293T细胞(数据仅供参考):

取 0.7×10^6 个293T细胞按说明书进行操作,结果如下:标准曲线: $y = 48152x + 521.17$,测定孔的荧光值 A_1 : 9614,对照孔的荧光值 A_2 : 4603,葡萄糖摄取量计算结果为:

$$\text{葡萄糖摄取量} = (9614 - 4603 - 521.17) \div 48152 = 0.093 \text{ nmol}/\mu\text{L}$$

按照说明书操作,测定 0.7×10^6 个293T细胞葡萄糖摄取量(如下图):



声明

1. 试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，我公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器，严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责，使用前请充分考虑样本可能的使用量，预留充足的样本。