

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

产品货号：GBQ054

产品规格：96T(40 samples)

检测仪器：荧光酶标仪(激发波长 535 nm，发射波长 587 nm)

Elabscience®果糖-6-磷酸(F-6-P)荧光法测试盒
Fructose-6-Phosphate(F-6-P) 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

本试剂盒适用于检测动植物组织及细胞样本中的果糖-6-磷酸(F-6-P)含量。

检测原理

果糖-6-磷酸(Fructose-6-Phosphate, F-6-P)是一种六碳糖，由果糖和磷酸酯化反应形成，是糖酵解和糖异生途径中的重要中间产物。作为生命体、细胞代谢过程中最基础的代谢物质，对其进行定量研究具有重要意义。

果糖-6-磷酸可在酶的作用下生成特定的产物，该产物与显色剂反应生成荧光产物，可在激发波长 535 nm，发射波长 587 nm 处检测荧光强度。

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)	缓冲液 (Buffer Solution)	30 mL×1 瓶	-20℃ 避光 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	底物 (Substrate)	粉剂×4 支	-20℃ 避光 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	酶试剂 (Enzyme Reagent)	粉剂×4 支	-20℃ 避光 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	1 mmol/L 标准品溶液 (1 mmol/L Standard Solution)	1 mL×1 支	-20℃ 避光 保存 6 个月
	96 孔黑色酶标板	1 板	无要求
	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：535 nm，发射波长：587 nm)、恒温箱、涡旋混匀仪

试剂：生理盐水(0.9% NaCl)

耗材：10 KD 超滤管

试剂准备

① 检测前，试剂盒中的试剂平衡至25℃。

② 试剂二工作液的配制：

取一支试剂二用4 mL试剂一溶解混匀，未使用的溶液2-8℃避光可保存3天。

③ 试剂三工作液的配制：

取一支试剂三用3 mL试剂一溶解混匀，未使用的溶液2-8℃避光可保存3天。

④ 35 $\mu\text{mol/L}$ 标准品溶液的配制：

按试剂四：双蒸水=35：965的体积比配制(例如配制1 mL 35 $\mu\text{mol/L}$ 的标准品溶液：取35 μL 试剂四加入965 μL 双蒸水稀释混匀)，未使用的溶液2-8℃避光可保存一周。

⑤ 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($\mu\text{mol/L}$)	0	7	14	17.5	21	24.5	28	35
35 $\mu\text{mol/L}$ 标准品溶液(μL)	0	40	80	100	120	140	160	200
双蒸水(μL)	200	160	120	100	80	60	40	0

样本准备

① 样本处理

组织样本：按照组织质量(g)与生理盐水(0.9% NaCl)体积(mL)=1：9的比例进行匀浆，4℃，10000 × g离心10 min，取上清液，使用10 KD超滤管4℃ 12000 × g离心15 min，收集滤液，置于冰上待测。

细胞样本：取1×10⁶个细胞，加入200 μL生理盐水(0.9% NaCl)匀浆，4℃，10000 × g离心10 min，取上清液，使用10 KD超滤管4℃ 12000 × g离心15 min，收集滤液，置于冰上待测。

② 样本的稀释

在正式检测前，需选择2-3个预期差异大的样本稀释成不同浓度进行预实验，根据预实验的结果，结合本试剂盒的线性范围：1.06-35.00 μmol/L，请参考下表稀释(仅供参考)：

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
10%小鼠肝组织	2-4	10%小鼠肾组织	2-4
10%小鼠心组织	3-6	10%小鼠肺组织	3-6
10%橘子果肉组织	2-5	10%橘子皮组织	不稀释
10%绿萝组织	2-5	1×10 ⁶ 个 Jurkat 细胞	不稀释
1×10 ⁶ 个 293T 细胞	不稀释	1×10 ⁶ 个 Hela 细胞	不稀释

注：稀释液为生理盐水(0.9% NaCl)。

操作步骤

- ① 标准孔：取 20 μL 不同浓度的标准品溶液加入到相应的酶标孔中。
测定孔：取 20 μL 待测样本，加入到相应的酶标孔中。
对照孔：取 20 μL 待测样本，加入到相应的酶标孔中。
- ② 向步骤①中标准孔和测定孔加入 200 μL 试剂二工作液。
- ③ 向步骤①中对照孔加入 200 μL 试剂三工作液。
- ④ 振板 5 s，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 5 min，使用荧光酶标仪于激发波长 535 nm，发射波长 587 nm 处检测各孔荧光值。

操作表

	标准孔	测定孔	对照孔
不同浓度标准品溶液(μL)	20	--	--
待测样本(μL)	--	20	20
试剂二工作液(μL)	200	200	--
试剂三工作液(μL)	--	--	200
振板 5 s，37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 5 min，使用荧光酶标仪于激发波长 535 nm，发射波长 587 nm 处检测各孔荧光值。			

结果计算

标准品拟合曲线: $y = ax + b$

组织样本中果糖-6-磷酸(F-6-P)含量计算公式:

$$\text{F-6-P 含量} \quad (\mu\text{mol/kg wet weight}) = \frac{\Delta F - b}{a} \div \frac{m}{V} \times f$$

细胞样本中果糖-6-磷酸(F-6-P)含量计算公式:

$$\text{F-6-P 含量} \quad (\text{nmol}/10^6) = \frac{\Delta F - b}{a} \div \frac{n}{V} \times f$$

注解:

y: 标准品荧光值-空白荧光值(标准品浓度为 0 时的荧光值)

x: 标准品的浓度

a: 标曲的斜率

b: 标曲的截距

ΔF : 样本的绝对荧光值(测定孔荧光值-对照孔荧光值)

V: 匀浆液体积, mL

m: 样本质量, g

f: 样本加入检测体系前的稀释倍数

n: 细胞样本数量/ 10^6

附录1 关键数据

1. 技术参数

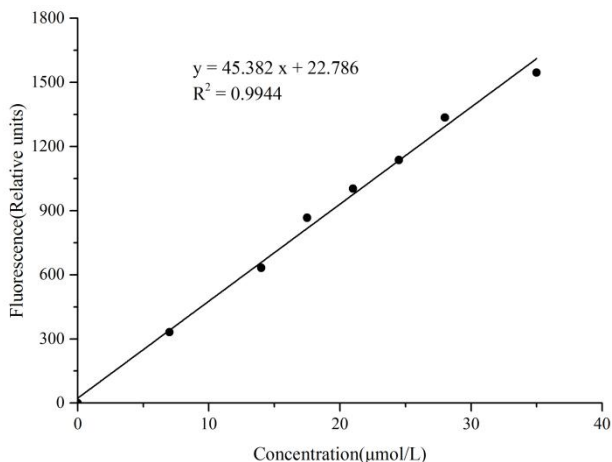
检测范围	1.06-35.00 $\mu\text{mol/L}$	批间差	5.7-9.8%
灵敏度	1.06 $\mu\text{mol/L}$	批内差	4.6-5.0%
加标回收率	91-96%		

2. 标准曲线(数据仅供参考)

① 不同浓度标准品加样量20 μL ，按照操作步骤进行实验，荧光值如下表所示：

标准品浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	0	7	14	17.5	21	24.5	28	35
荧光值	940	1292	1592	1783	1944	2065	2269	2439
	950	1262	1564	1841	1952	2099	2293	2543
平均荧光值	945	1277	1578	1812	1948	2082	2281	2491
绝对荧光值	0	332	633	867	1003	1137	1336	1546

② 绘制标曲(如下图)：



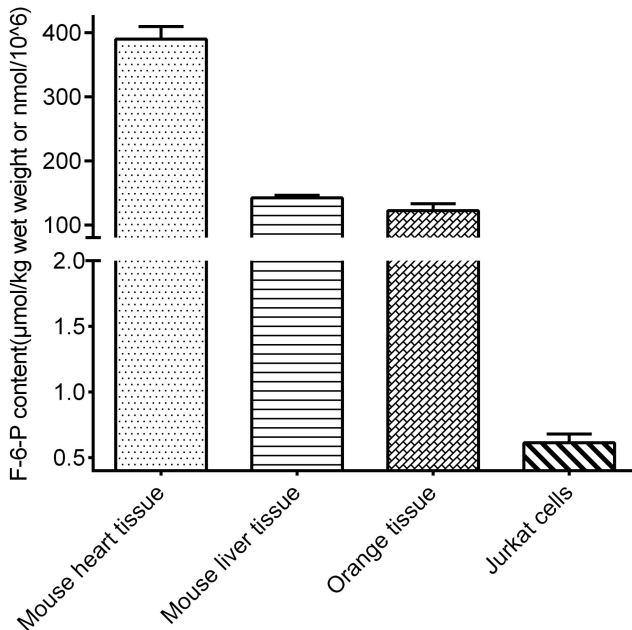
附录2 实例分析

例如检测小鼠心组织(数据仅供参考):

取20 μL 稀释4倍的10%小鼠心组织匀浆上清液,按操作表操作,结果如下:
标准曲线: $y = 45.382x + 22.786$, 测定孔平均荧光值为1706, 对照孔平均荧光值为1191, 计算结果为:

$$\begin{aligned}\text{F-6-P含量}(\mu\text{mol/kg wet weight}) &= (1706 - 1191 - 22.786) \div 45.382 \times 0.9 \div 0.1 \times 4 \\ &= 390.46 \mu\text{mol/kg wet weight}\end{aligned}$$

按说明书操作,测定小鼠心组织(稀释4倍,加样量20 μL)、小鼠肝组织(稀释4倍,加样量20 μL)、橘子果肉组织(稀释5倍,加样量20 μL)、Jurkat细胞(1×10^6 个,加样量20 μL)的F-6-P含量(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。

