

葡萄糖摄取检测试剂盒(DTNB法)

产品编号	产品名称	包装
S0556S	葡萄糖摄取检测试剂盒(DTNB法)	100次
S0556M	葡萄糖摄取检测试剂盒(DTNB法)	500次

产品简介:

- 碧云天的葡萄糖摄取检测试剂盒(DTNB法) (Glucose Uptake Assay Kit with DTNB), 又称葡萄糖摄入检测试剂盒(DTNB法)或DTNB法葡萄糖摄入检测试剂盒, 是一种基于DTNB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偶联酶促反应的生化方法, 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, 即图中的Step A。在谷胱甘肽还原酶(Glutathione reductase, GR)的作用下, 氧化型谷胱甘肽(Glutathione oxidized, GSSG)和生成的NADPH反应生成还原型谷胱甘肽(Glutathione reduced, GSH), GSH可以和生色底物DTNB反应产生黄色的TNB, 即图中的Step B。TNB在412nm左右有最大吸收峰, 通过检测反应体系中生成的TNB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。

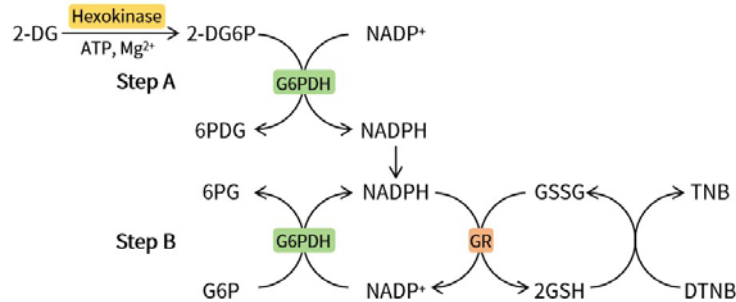


图1. 碧云天葡萄糖摄取检测试剂盒(DTNB法) (S0556)检测原理图。

- 本试剂盒检测灵敏度高, 线性范围宽, 样品用量少。本试剂盒在样品体积为25μl时可以检测样品中浓度低达0.04μM 2-DG (1pmol)的摄入, 在0.04-4μM (1-100pmol)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)。如果样品的葡萄糖摄取能力较强, 也可以使用测定方法更加便捷但检测灵敏度相对较低的葡萄糖摄取检测试剂盒(WST-8法) (S0554)。

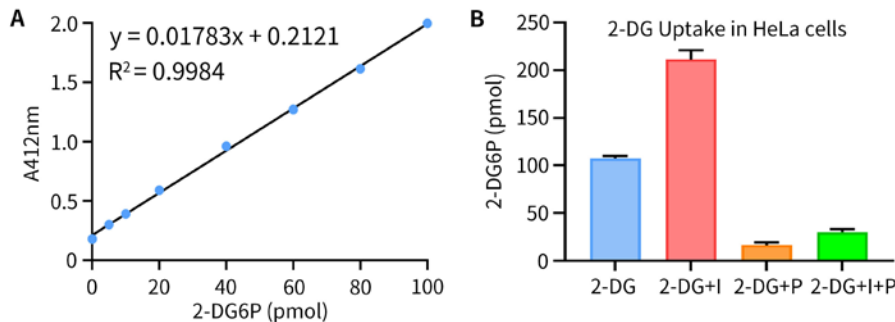


图2. 碧云天葡萄糖摄取检测试剂盒(DTNB法) (S0556)对于2-DG6P标准品和HeLa细胞样品的检测效果。图A为本试剂盒对标准品2-DG6P的检测效果, 图B为本试剂盒对油酸诱导后的HeLa细胞葡萄糖摄取能力的检测效果。油酸诱导后的96孔板培养的HeLa细胞参考本产品的使用说明, 经无血清低糖培养液孵育过夜后, 用KRPB Buffer孵育40分钟, 再如图所示使用胰岛素(Insulin)或/和根皮素(Phloretin)进行预处理, 再加入2-DG进行孵育, 适当洗涤后最终用100 μ l Glucose Uptake Lysis Buffer制备细胞裂解液样品。25 μ l不同浓度的2-DG6P标准品和10倍稀释的细胞裂解液样品(标准品和样品均使用Glucose Uptake Assay Buffer配制或稀释), 加入20 μ l Reaction Mix反应工作液混匀后, 37 $^{\circ}$ C避光孵育60分钟, 再加入5 μ l Stop Buffer混匀后70 $^{\circ}$ C避光孵育60分钟, 最后依次加入5 μ l GR Buffer、25 μ l Recycling Mix反应工作液和20 μ l DTNB工作液, 并依次混匀, 37 $^{\circ}$ C避光孵育40分钟, 测定A₄₁₂, 2-DG6P标准品在0.04-4 μ M (1-100pmol)浓度范围内有良好的线性关系。I, Insulin, 可增强葡萄糖摄入; P, Phloretin, 可抑制葡萄糖摄取。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, 检测灵敏度高。**相较于碧云天的同类产品葡萄糖摄取检测试剂盒(WST-8法) (S0554), 本试剂盒的检测过程相对复杂一些, 但是检测灵敏度提高了约40倍, 特别适用于葡萄糖摄入能力的高精度检测, 以及微量样品或葡萄糖摄入能力较低的样品的检测。
- **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
S0556S-1	Glucose Uptake Lysis Buffer	15ml
S0556S-2	Glucose Uptake Assay Buffer	10ml
S0556S-3	KRPB Buffer	12ml
S0556S-4	Enzyme Solution A	500 μ l
S0556S-5	Reaction Mix	200 μ l
S0556S-6	Stop Buffer	600 μ l
S0556S-7	GR Buffer	600 μ l
S0556S-8	Recycling Mix	200 μ l
S0556S-9	Enzyme Solution B	200 μ l
S0556S-10	DTNB (5X)	220 μ l
S0556S-11	2-DG (10mM)	1ml
S0556S-12	2-DG6P Standard (1mM)	20 μ l
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
S0556M-1	Glucose Uptake Lysis Buffer	70ml
S0556M-2	Glucose Uptake Assay Buffer	50ml
S0556M-3	KRPB Buffer	60ml
S0556M-4	Enzyme Solution A	2.5ml
S0556M-5	Reaction Mix	1ml
S0556M-6	Stop Buffer	3ml
S0556M-7	GR Buffer	3ml
S0556M-8	Recycling Mix	1ml
S0556M-9	Enzyme Solution B	1ml
S0556M-10	DTNB (5X)	1.1ml
S0556M-11	2-DG (10mM)	5ml
S0556M-12	2-DG6P Standard (1mM)	60 μ l
—	说明书	1份

保存条件:

-20 $^{\circ}$ C保存, 一年有效。其中DTNB (5X)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), 本试剂盒中提供的2-DG (10mM)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)。
- 经测试, 本试剂盒相对稳定, 检测所得的2-DG6P标准曲线的线性范围等通常和说明书中的描述一致, 但是实际效果可能会因为

实验条件、检测仪器等的不同而存在差异，例如最高浓度点的数据偏低或不在线性范围内等，通常可以舍去异常点的数据，取在线性范围内的数据来拟合标准曲线。

- Stop Buffer和GR Buffer有腐蚀性，操作时请小心，并确保有效防护以避免直接接触人体，并须注意避免腐蚀其它物品。
- 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。

- 融解Glucose Uptake Assay Buffer、Glucose Uptake Lysis Buffer、KRPB Buffer、Stop Buffer、GR Buffer和2-DG (10mM)，平衡至室温后混匀备用。Reaction Mix、Recycling Mix、Enzyme Solution A、Enzyme Solution B、DTNB (5X)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。
- Reaction Mix反应工作液(Reaction Mix Working Solution)的配制：按照每个反应20 μ l的体积配制适量的Reaction Mix反应工作液。均匀混合14 μ l Glucose Uptake Assay Buffer、4 μ l Enzyme Solution A和2 μ l Reaction Mix，即可配制成20 μ l Reaction Mix反应工作液。根据待检测样品和标准品的数量，配制适量的Reaction Mix反应工作液。具体配制方法参考下表。配制好的Reaction Mix反应工作液如果置于4 $^{\circ}$ 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 (μ l)	14	140	280	700
Enzyme Solution A (μ l)	4	40	80	200
Reaction Mix (μ l)	2	20	40	100
Reaction Mix Working Solution (μl)	20	200	400	1000

注：由于Enzyme Solution A和Reaction Mix的用量较少且易沉降，必须注意在使用前先轻轻离心一下，然后适当混匀后再使用。

- Recycling Mix反应工作液(Recycling Mix Working Solution)的配制：按照每个反应25 μ l的体积配制适量的Recycling Mix反应工作液。均匀混合20 μ l Glucose Uptake Assay Buffer、1 μ l Enzyme Solution A、2 μ l Recycling Mix和2 μ l Enzyme Solution B，即可配制成25 μ l Recycling Mix反应工作液。根据待检测样品和标准品的数量，配制适量的Recycling Mix反应工作液。具体配制方法参考下表。配制好的Recycling Mix反应工作液如果置于4 $^{\circ}$ 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 (μ l)	20	200	400	1000
Enzyme Solution A (μ l)	1	10	20	50
Recycling Mix (μ l)	2	20	40	100
Enzyme Solution B (μ l)	2	20	40	100
Recycling Mix Working Solution (μl)	25	250	500	1250

注：由于Enzyme Solution A、Recycling Mix和Enzyme Solution B的用量较少且易沉降，必须注意在使用前先轻轻离心一下，然后适当混匀后再使用。

- DTNB工作液的配制：取适量的DTNB (5X)，按照1:4的比例用Glucose Uptake Assay Buffer稀释成1X DTNB工作液。例如10 μ l DTNB (5X)中加入40 μ l Glucose Uptake Assay Buffer混匀即为50 μ l DTNB工作液。

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、肌肉细胞或肝脏细胞等，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100 μ l含有800 μ M油酸的完全培养液，培养箱继续培养24小时。推荐使用油酸(\geq 99%，Cell Culture Grade) (ST2053)。
- PBS洗涤细胞2次，每孔加入100 μ l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100 μ l KRPB Buffer，37 $^{\circ}$ 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⁺、GSH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100 μ g/ml)作为阳性对照，或加入抑制剂(如终浓度为150 μ M的根皮素)作为阴性对照，孵育20分钟。随后加入10 μ l 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10 μ l 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20 μ l 2-DG (10mM)。通过上述两种操作可以提高葡萄糖摄取检测灵敏度。

f. 使用PBS洗涤细胞3次，每孔加入100 μ l Glucose Uptake Lysis Buffer，适当吹打，充分裂解细胞。4 $^{\circ}$ C，14,000 \times 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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C或-80 $^{\circ}$ 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。

a. 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。

b. 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。

c. 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100 μ l Glucose Uptake Lysis Buffer)进行匀浆和裂解，随后4 $^{\circ}$ C，14,000 \times 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。

a. 2-DG6P标准曲线设置：取1 μ l 2-DG6P Standard (1mM)，加入249 μ l Glucose Uptake Assay Buffer，混匀，配制成浓度为4 μ M的2-DG6P标准溶液。分别取4 μ M 2-DG6P标准溶液0、1.25、2.5、5、10、15、20、25 μ l加入96孔板的标准品孔中，并相应地用Glucose Uptake Assay Buffer补足至25 μ l，此时，标准曲线的浓度和物质的量分别为0、0.2、0.4、0.8、1.6、2.4、3.2、4 μ M和0、5、10、20、40、60、80、100pmol。

b. 取1-25 μ l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25 μ l**。
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5 μ l，则n=10 \times 25/5=50)。

c. 每孔加入20 μ l Reaction Mix反应工作液，混匀，37 $^{\circ}$ C避光反应60分钟。

d. 每孔加入5 μ l Stop Buffer，混匀，70 $^{\circ}$ C避光反应60分钟。

e. 每孔加入5 μ l GR Buffer，混匀。

f. 每孔加入25 μ l Recycling Mix反应工作液，混匀。

g. 每孔加入20 μ l DTNB工作液，混匀。

h. 37 $^{\circ}$ C反应30-60分钟，每5分钟测定一次A₄₁₂，直至最高浓度标准品孔(100pmol)的信号值达到1.5-2左右。

注1：通常情况下，本试剂盒孵育35分钟左右，最高浓度标准品孔(100pmol)的信号值可以达到1.5左右，孵育45分钟左右，高浓度标准品孔(100pmol)的信号值可以达到2左右。

注2：为取得最佳的检测结果，反应时间也可以根据待测样品中2-DG的含量进行调整，但是必须确保读数在标准曲线范围内。可以进行动力学检测，对于2-DG含量较高的样品，测定总时间可以设为30分钟，对应的测定间隔时间设为5分钟；对于2-DG含量较低的样品，测定时长设为1小时，对应的测定间隔时间设为10分钟。也可以连续测定60分钟，每隔5分钟测定1次，最后取合适的时间点的数据用作分析和计算。

i. 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组信号比较高，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1-100pmol浓度范围内有良好的线性关系。2-DG摄入量计算公式如下：

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

注：A为步骤4i根据标准曲线确定的2-DG6P浓度(pmol)；

n为步骤4b样品总稀释倍数。

参考文献：

- Scoditti E, Sabatini S, Carli F, Gastaldelli A. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2024. 21(5):319-334.
- Jones JG. Diabetologia. 2016. 59(6):1098-103.
- Bose S, Le A. Glucose Metabolism in Cancer. Adv Exp Med Biol. 2018. 1063:3-12.
- Walker-Samuel S, Ramasawmy R, Torrealdea F, Rega M, Rajkumar V, et al. Nat Med. 2013. 19(8):1067-72.
- Hay N. Nat Rev Cancer. 2016. 16(10):635-49.
- Sylyow L, Kleinert M, Richter EA, Jensen TE. Nat Rev Endocrinol. 2017. 13(3):133-148.
- Yamamoto N, Sato T, Kawasaki K, Murosaki S, Yamamoto Y. Anal Biochem. 2006. 351(1):139-45.
- 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 2025.03.06