

葡萄糖摄取荧光检测试剂盒(2-NBDG)

产品编号	产品名称	包装
S0561S	葡萄糖摄取荧光检测试剂盒(2-NBDG)	10-100次
S0561M	葡萄糖摄取荧光检测试剂盒(2-NBDG)	50-500次

产品简介:

- 碧云天研发的葡萄糖摄取荧光检测试剂盒(2-NBDG) (Glucose Uptake Fluorescence Assay Kit with 2-NBDG), 又称葡萄糖摄入荧光检测试剂盒(2-NBDG)或2-NBDG葡萄糖摄入检测试剂盒(2-NBDG Glucose Uptake Assay), 是以一种荧光标记的脱氧葡萄糖类似物2-NBDG为葡萄糖示踪剂, 快速灵敏地检测细胞葡萄糖摄取的试剂盒。本试剂盒可使用荧光显微镜、激光共聚焦显微镜、流式细胞仪、荧光酶标仪等荧光检测系统进行检测。
- 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]。
- 2-NBDG, 2-(N-7-硝基-2,1,3-苯并恶二唑-4-氨基)-2-脱氧-D-葡萄糖, 分子量为342.3, 分子式为 $C_{12}H_{14}N_4O_8$, CAS号为186689-07-6, 是一种荧光标记的脱氧葡萄糖类似物, 可以通过葡萄糖转运蛋白进入细胞内, 己糖激酶将其磷酸化后会滞留在细胞内, 从而在细胞内积累, 因此2-NBDG产生的荧光与细胞的葡萄糖摄取成正比, 可通过荧光显微镜、流式细胞仪和荧光酶标仪等测量荧光强度, 从而反映葡萄糖摄取情况[7-8]。
- 本试剂盒检测葡萄糖摄取的原理如图1所示。2-NBDG通过与葡萄糖相同的葡萄糖转运蛋白(GLUTs)转运到细胞中, 随后在C-6位置发生磷酸化, 产生2-NBDG-6-磷酸(2-NBDG-6-phosphate), 在细胞内积累, 并产生强烈的绿色荧光。

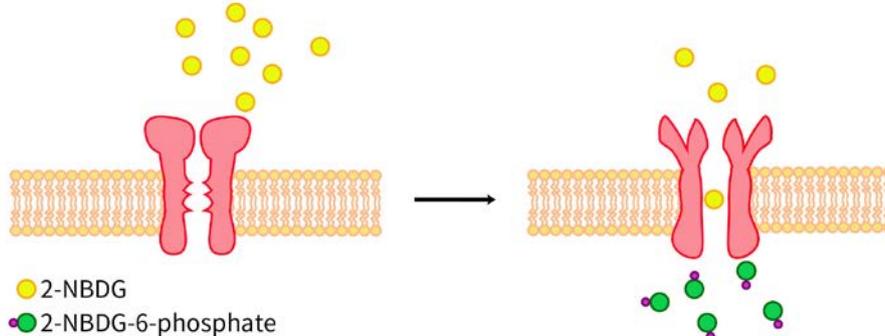


图1. 碧云天葡萄糖摄取荧光检测试剂盒(2-NBDG) (S0561)检测原理图。

- 本试剂盒各组分推荐的最终使用浓度经过优化, 对大多数细胞都适用, 但为了得到更满意的检测结果, 对于不同类型的细胞请自行进行一定摸索, 2-NBDG (50X)的终浓度通常为0.25-2X, 最优先的推荐终浓度为1X。同时, 本试剂盒提供的Glucose Uptake Inhibitor可以作为抑制葡萄糖摄取的阳性对照, 同时本试剂盒提供PI (Propidium Iodide/碘化丙啶), 用于检测分析时排除死细胞。使用本试剂盒结合流式细胞仪或荧光显微镜检测细胞的葡萄糖摄取的效果参考图2和图3。

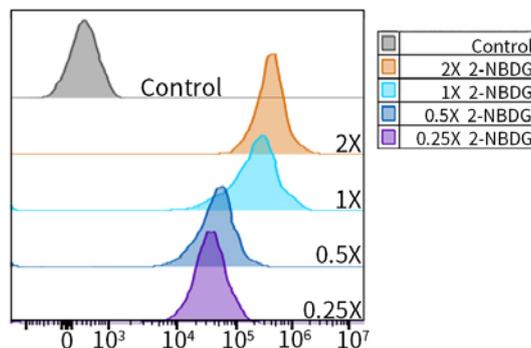


图2. 碧云天葡萄糖摄取荧光检测试剂盒(2-NBDG) (S0561)检测Jurkat细胞(人T淋巴细胞瘤细胞)葡萄糖摄取的流式细胞检测效果图。Jurkat细胞使用无糖RPMI 1640培养液(C2727)配制的完全培养液(即添加10%血清)孵育2小时后, 使用本试剂盒配制的0.25-2X的2-NBDG葡萄糖摄取工作液染色并使用流式细胞仪检测。图中可见, 葡萄糖饥饿处理后的Jurkat细胞可摄取较多2-NBDG, 荧光强度随着2-NBDG的浓度增加而增强。Control组未使用2-NBDG。实际结果会因实验条件、检测仪器等的不同而存在差异, 图中效果仅供参考。

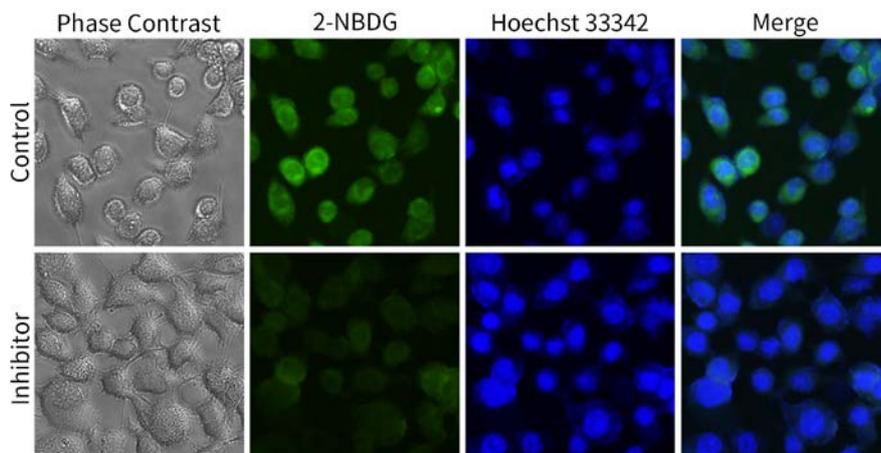


图3. 碧云天葡萄糖摄取荧光检测试剂盒(2-NBDG) (S0561)检测L929细胞(小鼠成纤维细胞)葡萄糖摄取的效果图。L929细胞使用无糖DMEM培养液(C2715)配制的完全培养液(即添加10%血清)孵育6小时后, 不处理或用Glucose Uptake Inhibitor处理后, 使用本试剂盒配制的2-NBDG葡萄糖摄取工作液和Hoechst 33342进行染色。葡萄糖饥饿处理后的L929细胞摄取较多2-NBDG, 细胞中绿色荧光较强; 而使用Glucose Uptake Inhibitor处理后, 抑制葡萄糖转运蛋白(GLUTs), 从而抑制2-NBDG转运入细胞, 因此细胞中绿色荧光非常弱。蓝色荧光为Hoechst 33342标记的所有细胞的细胞核。本试剂盒中不提供Hoechst 33342, 如有需要, 可向碧云天订购Hoechst 33342活细胞染色液(100X) (C1027-C1029)。实际检测效果会因实验条件、检测仪器等的不同而存在差异, 图中效果仅供参考。

- 本试剂盒小包装和中包装, 2-NBDG (50X)按照1:50的比例稀释, 6孔板每孔检测体系为1ml时, 可以分别进行10和50次检测; 96孔板每孔检测体系为100 μ l时, 可以分别检测100和500次。

包装清单:

产品编号	产品名称	包装
S0561S-1	2-NBDG (50X)	200 μ l
S0561S-2	Glucose Uptake Inhibitor (100X)	30 μ l
S0561S-3	Glucose Uptake Assay Buffer	50ml
S0561S-4	PI (1000X)	20 μ l
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
S0561M-1	2-NBDG (50X)	1ml
S0561M-2	Glucose Uptake Inhibitor (100X)	100 μ l
S0561M-3	Glucose Uptake Assay Buffer	250ml
S0561M-4	PI (1000X)	60 μ l
—	说明书	1份

保存条件:

-20 $^{\circ}$ C保存, 一年有效。其中2-NBDG (50X)和PI (1000X)须避光保存。

注意事项:

- 荧光染料均存在淬灭问题, 请尽量注意避光, 以减缓荧光淬灭。
- 由于2-NBDG的荧光信号不是很强, 用于荧光酶标仪检测时的读值较低, 相应的葡萄糖摄取增加或减少的倍数差异会比较小。如果使用荧光酶标仪检测, 需进行一定的条件优化, 同时须使用适合荧光检测的黑板或白板, 推荐使用碧云天BeyoGold™全黑96孔细胞培养板(平底带盖, 独立包装) (FCP966)或BeyoGold™黑色透明底96孔细胞培养板(平底带盖, 独立包装) (FCP965)。对于葡萄糖摄取的定量检测, 推荐葡萄糖摄取检测试剂盒(WST-8法) (S0554)或葡萄糖摄取检测试剂盒(DTNB法) (S0556)。
- 2-NBDG (50X)、Glucose Uptake Inhibitor (100X)第一次使用时请适当分装后-20 $^{\circ}$ C保存, 以避免反复冻融。
- 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:

基于2-NBDG葡萄糖摄取的具体使用方法差异比较大, 具体对于特定的细胞请参考文献或根据检测效果进行调整和优化。

1. 2-NBDG葡萄糖摄取工作液的配制。

6孔板每孔所需2-NBDG葡萄糖摄取工作液的量为1ml, 其它培养器皿的2-NBDG葡萄糖摄取工作液的用量以此类推; 对于细胞悬液每50-100万细胞需0.5ml 2-NBDG葡萄糖摄取工作液。取适量2-NBDG (50X), 按照每20 μ l 2-NBDG (50X)加入980 μ l Glucose Uptake Assay Buffer的比例进行配制, 混匀后即为2-NBDG葡萄糖摄取工作液。

注1: 配制2-NBDG葡萄糖摄取工作液时注意避光, 配制好的2-NBDG葡萄糖摄取工作液必须一次使用完毕, 不能冻存。

注2: 2-NBDG葡萄糖摄取工作液中2-NBDG的最终浓度需根据不同细胞系和实验体系通过预实验进行优化。2-NBDG的推荐工作浓度为1X, 可以在0.25-2X范围内摸索最佳工作浓度。

注3: Glucose Uptake Assay Buffer也可以使用其它合适的溶液, 如无血清无糖培养液、HBSS (C0218)或PBS (C0221A/C0221D)稀释2-NBDG (50X)。

2. 细胞培养。

根据药物处理的时间, 将适量细胞接种在合适的培养器皿中。通常要求在葡萄糖摄取检测前的细胞汇合度约为70-90%。

3. 细胞的葡萄糖饥饿预处理(选做)。

待测细胞接种培养过夜后, 吸除培养液, 用PBS或其它适当溶液洗涤细胞一次, 加入无葡萄糖的完全培养液(含适量血清)继续培养1-6个小时, 对于通常使用高糖培养液进行培养的细胞也可考虑使用低糖的完全培养液继续培养1-24个小时进行葡萄糖饥饿处理。

注1: 根据实验设计, 可对细胞进行葡萄糖饥饿预处理, 以增强葡萄糖摄取[9]。如果所检测的细胞本身的葡萄糖摄取能力比较强, 则可不进行葡萄糖饥饿预处理。对于细胞的葡萄糖饥饿处理, 时间不宜过长, 避免造成细胞的损伤。使用无葡萄糖的完全培养液处理不应超过6个小时, 低糖的完全培养液通常不应超过24个小时。推荐使用碧云天无葡萄糖或低葡萄糖DMEM培养液(C2715/C2712)或无葡萄糖RPMI 1640培养液(C2727)配制的完全培养液。

注2: 培养液中的血清添加量可根据实验设计进行一定的调整。

注3: 如果需要使用胰岛素增强葡萄糖的摄取, 推荐碧云天的Insulin (P3376/P3378)。

4. 细胞的药物处理。

吸除培养液, 根据实验设计将感兴趣的药物用细胞培养液配制后处理细胞一定时间。如果不进行药物的处理, 仅进行细胞的葡萄糖摄取能力测试, 则直接转至步骤5或6。

注1: 对于细胞的药物处理, 推荐使用无葡萄糖的细胞培养液稀释药物, 避免葡萄糖对实验的影响。

注2: 通常需要设置适当的对照, 如药物溶剂的对照、无细胞但含细胞培养液及测试药物的对照。

5. 对照的设置(选做)。

在葡萄糖摄取检测前, 可设置抑制葡萄糖摄取的阳性对照。将试剂盒中提供的Glucose Uptake Inhibitor (100X)推荐按照1:100的比例加入到适当的培养液中, 处理细胞30分钟。随后参照步骤6加入2-NBDG葡萄糖摄取工作液, 进行细胞葡萄糖摄取检测。对于大多数细胞, 通常Glucose Uptake Inhibitor (1X)处理30分钟后即可有效抑制2-NBDG转运入细胞, 2-NBDG摄取被抑制后呈现微弱的绿色荧光; 而2-NBDG在正常细胞中摄取后应呈现较强的绿色荧光。对于特定的细胞, Glucose Uptake Inhibitor作用浓度和作用时间可能有所不同, 需自行摸索最佳工作浓度和作用时间, 甚至某些细胞可能对Glucose Uptake Inhibitor不敏感。

6. 细胞的葡萄糖摄取检测。

a. 对于悬浮细胞(以6孔板为例)。

(a) 细胞按照实验设计进行一定处理后, 酌情取约10-100万细胞600 \times g室温离心5分钟, 弃上清。加入适当体积(如1ml)的2-NBDG葡萄糖摄取工作液重悬细胞, 使细胞密度为100万-1000万/ml, 并加入至6孔板中。

(b) 细胞培养箱中37 $^{\circ}$ C孵育30-60分钟, 不同的细胞最佳孵育时间不同。以30分钟作为初始孵育时间, 根据实际所用的细胞对孵育时间进行适当优化以得到最佳的效果。

(c) 37 $^{\circ}$ C孵育结束后, 600 \times g 4 $^{\circ}$ C离心3-4分钟, 沉淀细胞。弃上清, 注意尽量不要吸除细胞。

(d) 用PBS洗涤2次: 加入1ml PBS重悬细胞, 600 \times g 4 $^{\circ}$ C离心3-4分钟, 弃上清。再加入1ml PBS重悬细胞, 600 \times g 4 $^{\circ}$ C离心3-4分钟, 弃上清。

(e) 如果需要对细胞核进行染色, 可以参照步骤7进行。如无其它的特殊需要, 再用适量PBS重悬细胞后, 用荧光显微镜或激光共聚焦显微镜对细胞的葡萄糖摄取进行观察, 也可以用流式细胞仪分析。

注: 如果希望同时监测死细胞, 可以考虑使用PBS配制的PI (1X)进行染色, PI为红色荧光, Ex/Em=535/617nm, 仅染色细胞膜完整性丧失的坏死细胞, 因此可用于荧光显微镜下直接观察到死细胞, 或流式分析时从门控(Gating)中排除死细胞。

b. 对于贴壁细胞(以6孔板为例)。

(a) 吸除培养液, 根据具体实验如有必要可以用PBS或其它适当溶液洗涤细胞一次。如下以6孔板的一个孔为例进行说明, 如果使用其它的多孔板, 各种试剂的用量需要相应按比例调整。

(b) 加入1ml 2-NBDG葡萄糖摄取工作液。细胞培养箱中37 $^{\circ}$ C孵育30-60分钟, 不同的细胞最佳孵育时间不同。以30分钟作为初始孵育时间, 根据作用细胞对孵育时间进行适当优化以得到最佳的效果。

(c) 37 $^{\circ}$ C孵育结束后, 吸除上清, 用PBS洗涤2次。

(d) 如果需要对细胞核进行染色, 可以参照步骤7进行。如无其它的特殊需要, 再加入2ml PBS, 荧光显微镜或激光共聚焦显微镜下对摄取葡萄糖的细胞进行观察。

注1: 对于贴壁细胞, 如果希望采用流式细胞仪检测, 可以先消化并收集细胞, 重悬后参考悬浮细胞的检测方法。

注2: 如果希望同时监测死细胞, 可以考虑使用PBS配制的PI (1X)进行染色, PI为红色荧光, Ex/Em=535/617nm, 仅染色细胞膜完整性丧失的坏死细胞, 因此可用于荧光显微镜下直接观察到死细胞, 或流式分析时从门控(Gating)中排除死细胞。

7. 细胞核染色(选做)。

注：为了检测细胞的葡萄糖摄取情况或方便观察每个细胞，可以考虑使用Hoechst 33342进行细胞核染色，推荐碧云天Hoechst 33342染色液(C1025-C1029)。

- 接步骤6a(e)或6b(d)，每孔加入一定量Hoechst 33342溶液，室温避光孵育10分钟。
- 吸除Hoechst 33342溶液，用PBS洗涤2次(悬浮细胞需离心)。
- 随后即可进行荧光检测。Hoechst 33342为蓝色荧光，最大激发波长为346nm，最大发射波长为460nm。

8. 2-NBDG荧光检测的参数设置。

使用488nm激发波长，542nm发射波长，检测不同组别细胞荧光的强弱。2-NBDG的荧光光谱和Fluorescein非常相似，可以用检测Fluorescein或者FITC的参数设置进行检测。

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, 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.
- Zhu Y, Fan Z, Wang R, Xie R, Guo H, et al. Cell Mol Neurobiol. 2020. 40(5):801-812.
- Frees AE, Rajaram N, McCachren SS 3rd, Fontanella AN, Dewhirst MW, et al. PLoS One. 2014. 9(12): e115529.
- Bala M, Gupta P, Gupta S, Dua A, Injeti E, Mittal A. J Pharmacol Toxicol Methods. 2021. 109:107069.

相关产品：

产品编号	产品名称	包装
ST1024	D-2-脱氧葡萄糖(≥99%, Reagent grade)	250mg/1g/5g
ST1228	D-(+)-葡萄糖(≥99.5%, BioReagent)	250g/1kg/6×1kg
ST2078	2-NBDG (≥98%, BioReagent)	5mg/20mg/100mg
ST2082	2-DG6P (≥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 2025.01.13