

# 2-Deoxyglucose (2DG) Uptake Measurement Kit

Cat. No. CSR-OKP-PMG-K01

Last Updated on May 18th, 2022

[www.cosmobiousa.com](http://www.cosmobiousa.com)

## 【 1 】 Introduction

Measurement of 2-deoxyglucose (2DG) uptake in tissues and cells is a reliable approach for estimating glucose uptake and thereby to explore the regulation of glucose metabolism and mechanisms of insulin resistance. While assays employing radioisotope-labeled 2DG are often used to measure 2DG uptake in vivo and in vitro, the use of radioisotopes is not possible without problems including permitting, handling, and disposal. Furthermore, in actual practice, radioactive assay protocols for 2DG uptake require a corrective separation step to account for labeled 2DG that remains in extracellular fluids and can lead to substantial variation. Such problems are obviated by the enzymatic method of 2DG detection employed by this kit, based on published methods (Saito K and Minokoshi Y, et al. Analytical Biochem 412: 9-17, 2011).

## 【 2 】 Advantages

1. Does not use radioisotope (RI) or require radiation counting instrumentation.
2. Photometric readout on standard microplate readers.
3. Direct measurement of 2DG6P accumulated in cells.
4. High sensitivity through a recycling enzymatic amplification reaction.

## 【 3 】 Assay Principle

This assay has five key steps:

1. Oxidation of glucose-6-phosphate (G6P) with a low concentration of G6P dehydrogenase (G6PDH) with NAD<sup>+</sup> to eliminate endogenous G6P in target cells.
2. Elimination of NAD(P)H with HCl, which removes endogenous NAD(P)H as well as NADH produced in Step 1 in Figure 1.
3. Generation of NADPH through oxidation of 2DG6P in the cells with a high concentration of G6PDH, with the generated NADPH being used for quantification of 2DG6P.
4. Elimination of NAD(P)<sup>+</sup> and G6PDH that remains after Step 2 in Figure 1 with NaOH.
5. Recycling amplification reaction for the small amount of NADPH generated, and quantification of 2DG6P using a photometric microplate reader at 420 nanometers wavelength.

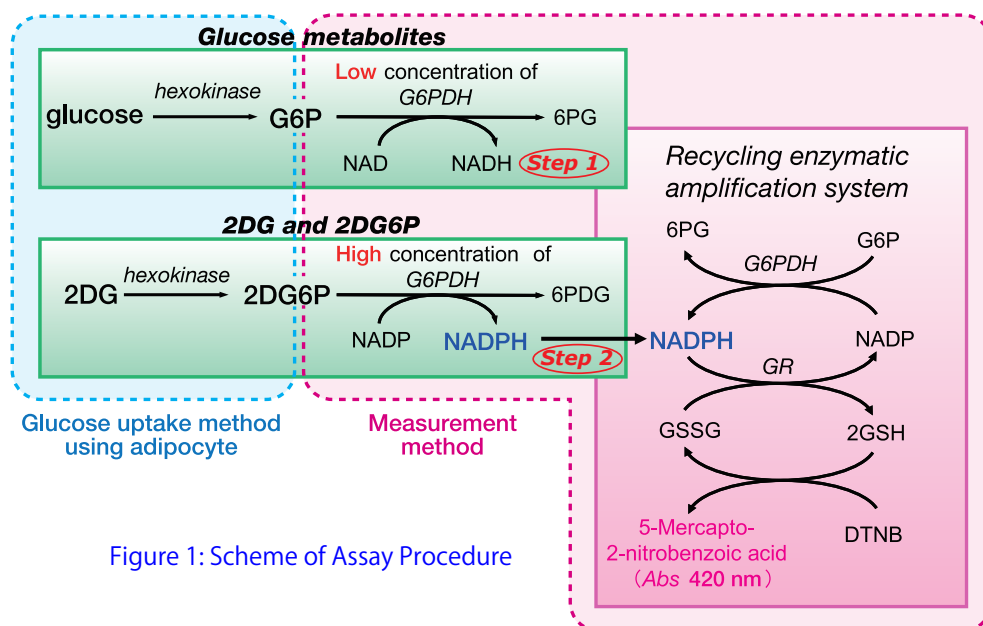


Figure 1: Scheme of Assay Procedure

## 【 4 】 Kit Components

Reagents for 50 reactions.

Unopened kit is stable at -20°C until expiration date printed on the label.

Reagent	Volume	Quantity	Storage	
Solution A (Including NAD)	3,400 µL	1 tube	Opened kit stable at 4° C	
Solution B (Acid Solution)	1,000 µL	1 tube		
Solution C (Acid Neutralizing Solution)	1,000 µL	1 tube		
Solution D (Including NADH)	1,600 µL	1 tube		
Solution E (Alkali Solution)	1,000 µL	1 tube		
Solution F (Alkali Neutralizing Solution)	1,000 µL	1 tube		
Solution G (Including GSSG and G6P)	2,000 µL	1 tube		
1mM 2DG6P Solution	500 µL	1 tube		
Sample Diluent Buffer Concentrate (100-fold Concentrated Solution)	3 mL	1 tube		
Substrate Buffer	11 mL	1 vial		
DTNB Substrate (Powder)	Reconstitute to 2 mL/vial	5 vials		
Low G6PDH	25 µL	1 tube *Red Cap Tube		Opened kit stable at -20° C
High G6PDH	250 µL	1tube *Black Cap Tube		
GR	20 µL	1tube *Blue Cap Tube		

\*G6PDH: Glucose-6-phosphate dehydrogenase

\*GR: Glutathione Reductase

## 【 5 】 Preparation of Reaction Solutions

### Preparation of 1x Sample Diluent Buffer

- Dilute 1mL of Sample Diluent Buffer Concentrate with 99 mL of ultrapure water, and mix completely.
- 1x sample diluent buffer can be stored in a refrigerator for 3 months.

### Preparation of 2DG6P standard

- Prepare a 2DG6P standard dilution series by diluting the 1mM 2DG6P solution in 1x sample diluent buffer in the range of 0 to 5  $\mu$ M 2DG6P.
- 2DG6P standard can be stored at 4° C for one week.

### Preparation of Reaction Mix A (assay uses 60 $\mu$ L Reaction Mix A per sample)

- Prepare Reaction Mix A for 10 samples as shown in Table 1. Mix completely by gentle vortex. (Prepare Reaction Mix A before use and hold on ice until use).

**TABLE 1**

Reagent	Total volume required for 10 assay points (Includes overage to compensate for volume loss)
Solution A	650 $\mu$ L
Low G6PDH Red Cap Tube	3 $\mu$ L

- \* Before opening the Low G6PDH tube, spin briefly to collect all contents.
- \* Pipette the Low G6PDH solution carefully and slowly as it contains 50% glycerol and is very viscous.
- \* Keep the Low G6PDH tube at -20° C until just before use. Return to -20° C promptly after use.

### Preparation of Reaction Mix D (assay uses 30 $\mu$ L Reaction Mix D per sample)

- Prepare Reaction Mix D for 10 samples as shown in Table 2, and mix completely by gentle vortex. (Prepare just before use. Hold on ice until use. → Refer to 【6】 Measurement Method, step (7) on page 4).

**TABLE 2**

Reagent	Total volume required for 10 assay points (Includes overage to compensate for volume loss)
Solution D	290 $\mu$ L
High G6PDH Black Cap Tube	30 $\mu$ L

- \* Before opening the High G6PDH tube, spin briefly to collect all contents.
- \* Pipette the High G6PDH solution very carefully and slowly as it contains 50% glycerol and is very viscous.
- \* Keep the Low G6PDH tube at -20° C until just before use. Return to -20° C promptly after use.

### Preparation of Chromogenic Solution

- To one vial of DTNB Substrate, add 2mL of Substrate Buffer and mix thoroughly for complete dissolution.
- Reconstituted Chromogenic Solution can be stored in the dark at 4° C for one week.

Preparation of Enzyme Cycling Solution (assay uses 70  $\mu$ L Enzyme Cycling Solution per sample)

- Prepare an Enzyme Cycling Solution for 10 samples as shown in Table 3 and mix completely by gentle vortex.  
(Prepare Enzyme Cycling Solution just before use and hold on ice use. → Refer to 【 6 】 Measurement Method, Step (13) on page 4.)

**TABLE 3**

Reagent	Total volume required for 10 assay points (Includes overage to compensate for volume loss)
Solution G	360 $\mu$ L
Chromogenic Solution	360 $\mu$ L
High G6PDH Black Cap Tube	10 $\mu$ L
GR Blue Cap Tube	2 $\mu$ L

- \* Before opening High G6PDH and GR tubes, spin briefly to collect all contents.
- \* Pipette the High G6PDH and GR solutions carefully and slowly as they contain 50% glycerol and are very viscous.
- \* Keep the High G6PDH and GR tubes at  $-20^{\circ}$  C until just before use. Return to  $-20^{\circ}$  C promptly after use.

## 【 6 】 Measurement Method

Read the following precautions prior to measurement.

- Make sure liquid adhering to the inner surface of reagent tubes is all collected at the tube bottom by spinning briefly before adding each reagent (before opening the tubes, etc.) and after adding and mixing each reagent. Please note that measurement results may have a major error if operation is done with droplets of reagent attached to the inner surface.
- Cap the tubes or seal the plate with an adhesive cover at each incubation step.
- Refer to 【7】 An example of unknown sample preparation.

Quantity of solution to be added per sample is as shown below.

1. Add 60  $\mu$ L of Reaction Mix A to each well of a 96-well microplate.
2. Add 20  $\mu$ L of 2DG6P standard or the unknown sample 20 $\mu$ L to each well and mix completely.
3. Incubate for 16 hours or more at room temperature ( $20-25^{\circ}$  C).
4. Add 5  $\mu$ L of Solution B to each well and mix completely.
5. Incubate at  $38^{\circ}$  C for one hour.
6. Add 5  $\mu$ L of Solution C to each well and mix completely.
7. Let stand 5-10minutes at room temperature while preparing Reaction Mix D.
8. Add 30  $\mu$ L of Reaction Mix D to each well and mix completely.
9. Incubate for 1 hour at  $38^{\circ}$  C.
10. Add 5  $\mu$ L of Solution E to each well and mix completely.
11. Incubate at  $70^{\circ}$  C for one hour, and immediately chill on ice for 5 minutes.
12. Add 5 $\mu$ L of the Solution F to each well, and mix completely.
13. Let stand for 5-15 minutes at room temperature while preparing Enzyme Cycling Solution.
14. Add 70 $\mu$ L of Enzyme cycling solution to each well at the same time and mix completely.

- Immediately, read the optical density (OD) of each well using a microplate reader. Set the microplate reader at 420 nm (within the range of 420-430 nm) and preheated to 25-30°C. On a kinetic program: read every 1-5 minutes over a period of 30 minutes. Determine the 2DG6P uptake concentration in an unknown sample solution using the calibration curve prepared with the 2DG6P standard solutions. In case it is unavoidable to use spectrophotometer with micro cuvette for measurement, add 50  $\mu$ L of 5 M sodium chloride to color developing reaction to stop the reaction. Then, measure the absorbance at 420 nm immediately.

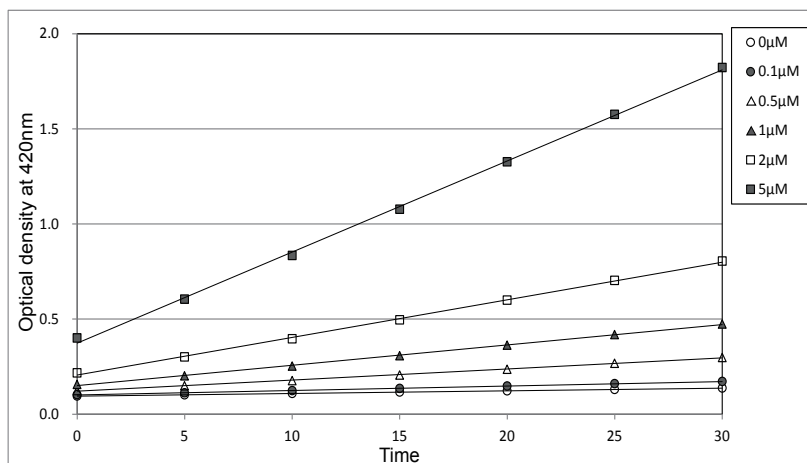


Figure 2: Temporal change of O.D. for different concentrations of 2DG6P

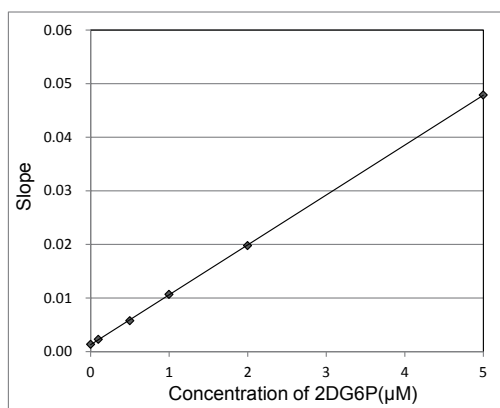


Figure 3: Calibration curve by kinetic method  
 (30 minutes incubation)

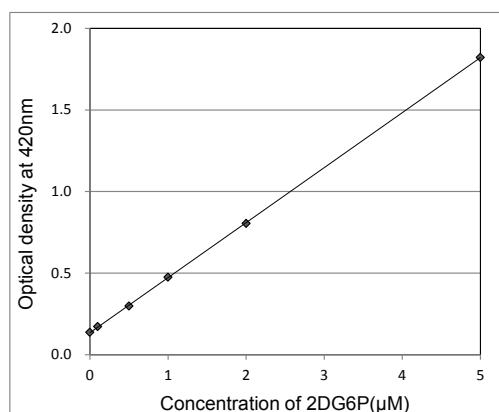


Figure 4: Calibration curve by end point method  
 (30 minutes incubation)

## 【 7 】 An Example of Glucose Uptake Method - Glucose uptake method using adipocyte

Types of reagents required:

- 6-well culture plate for adipocytes, such as 3T3-L1 cell.
- Serum-free medium
- Krebs Ringer Phosphate Hepes (KRPH) buffer kept at 37° C temperature (1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 1.3 mM CaCl<sub>2</sub>, 118 mM NaCl, 5 mM KCl, 30 mM Hepes, pH7.5)
- BSA (essentially fatty acid free and globulin free grade, e.g. use an item equal to Sigma Cat. No. A0281)
- 2-Deoxy-D-glucose (2DG) solution
- Insulin solution
- PBS(-)
- Phloretin (or glucose uptake inhibitor, such as Cytochalasin B)
- 10 mM Tris-HCl buffer (pH8.0)

An example of method (This procedure is for a 6-well culture plate)

Each measurement should be started with an optimization of reagent concentration and reaction time, depending on the type of cells and differentiation level of cells.

1. Prepare differentiated adipocytes to the 6-well culture plate.
2. Remove the medium from the culture plate wells, and incubate the cells in serum-free medium for 6 hours.
3. Gently wash the cells 3 times with 3 mL of warm KRPH buffer.
4. Gently add 3 mL of warm KRPH buffer containing 2% of BSA to each well.
  - \* Add insulin, Phloretin or 2DG as mentioned hereafter as necessary, based on the purpose of measurement.
5. Add insulin solution to a final concentration of 1  $\mu$  M and incubate at 37° C.
6. Add phloretin solution to a final concentration of 200-1,000  $\mu$  M 16 minutes after adding insulin solution.
7. Add 2DG solution to a final concentration of 1 mM 18 minutes after adding insulin solution, and incubate at 37° C for 20 minutes.
8. Remove medium and gently wash the cells 3 times with cooled PBS containing 200  $\mu$  M phloretin.
9. Add 3 mL of 10 mM Tris-HCl buffer (pH8.0) to each well, cells are disrupted by microtip sonicator.
  - \* Do not use NaOH solubilization in cell lysate method which might destroy 2DG6P.
10. Collect cell lysate to tube and apply heat treatment at 80° C for 15 minutes.
11. Centrifuge at 4° C, at 15,000 x g for 20 minutes, and transfer the supernatant to a new tube.
12. A part of the supernatant diluted  $\geq$  1:4 with 1x sample diluent buffer (see II. Preparation of Reaction Solutions for 1x Sample Diluent Buffer) is used as unknown sample for III. Measurement Method.
  - \* Cell lysate (supernatant) should be stored at -20° C.
  - \* Do not add protease inhibitor or reducing agent such as 2-mercaptoethanol or dithiothreitol to the cell lysate.

An example of actual measurement

See Figure 5 for the measurement result of 3T3-L1 cell extraction implemented according to the example of aforementioned method and addition schedule below (\*Note that this is an example of measurement).

Additives	Sample A	Sample B	Sample C	Sample D
Insulin	-	-	-	+
2DG	-	+	+	+
Phloretin	-	-	+	-

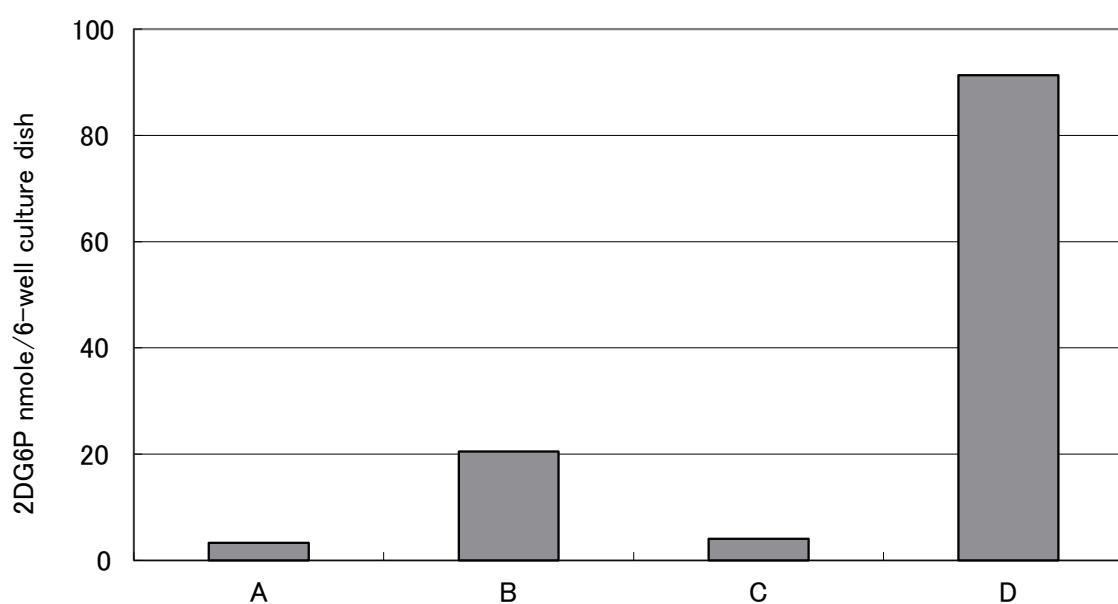


Figure 5: Measurement result

#### References

- Monden M, et. al., Diabetes. 2013 Feb;62(2):478-89. PMID : [23011593](#)
- Wang X, et. al., Diabetes. 2013 Feb;62(2):444-56. PMID : [23086038](#)
- Woo MS, et. al., Phytoter Res. 2013 Jul;27(7):1102-5. PMID : [22991308](#)
- Saito K, et.al., Anal Biochem. 2011 May 1;412(1):9-17. PMID : [21262191](#)
- Bo M. Jørgensen, et. al., Anal Biochem. 1979 Nov 1;99(2):297-303.

*For research use only. Not for clinical diagnosis.*



COSMO BIO Co., LTD.

【JAPAN】  
TOYO EKIMAE BLDG. 2-20, TOYO 2-CHOME,  
KOTO-KU. TOKYO 135-0016, JAPAN  
Phone: +81-3-5632-9610  
FAX: +81-3-5632-9619  
URL: <https://www.cosmobio.co.jp/>



COSMO BIO USA

【Outside Japan】  
2792 Loker Ave West, Suite 101  
Carlsbad, CA 92010, USA  
email: [info@cosmobioua.com](mailto:info@cosmobioua.com)  
URL: [www.cosmobioua.com](http://www.cosmobioua.com)  
Phone/FAX: (+1) 760-431-4600



一般研究用キット

# 2-Deoxyglucose (2DG) Uptake Measurement Kit

2- デオキシグルコース (2DG) 代謝速度測定キット

Cat. No. OKP-PMG-K01

2024年11月12日作成

[www.cosmobio.co.jp](http://www.cosmobio.co.jp)

## 【1-1】背景と測定原理

インスリンは血糖を下げるホルモンで、その作用は脂肪細胞や骨格筋などインスリン感受性臓器を中心に糖輸送活性を促進し、細胞外から細胞内へ糖を取り込ませることが知られています。

糖取込み量を測定するには、一般的に<sup>3</sup>Hなどで放射性ラベルした3-O-メチル-D-グルコースや2-デオキシグルコース(2DG)を用いる方法でおこなっています。この方法では放射性同位体を使用するためRI管理区域内のみしか使用することができず、使用する上で厳しい制限があるため通常の実験室レベルでは使用することができません。

本製品は、非放射性物質である2-デオキシグルコースを用いて細胞内に取込ませた後、細胞抽出液を2段階の酵素反応および酵素サイクリング法で糖取込み量を測定するキットです。

この測定方法の特徴は以下の通りです。

- non-RI法なので通常の実験室レベルで測定できる。
- 2DG6Pを測定するので細胞内の糖取り込み量を定量することができ、細胞外に存在する2DGの影響を受けない。
- 酵素サイクリング法で高感度に検出できる。

本製品は、大学共同利用機関法人 自然科学研究機構 生理学研究所 箕越教授からのライセンス品です。

細胞内に取り込まれた2DGは、ヘキソキナーゼによって2DG6Pにリン酸化されるが、次の酵素反応に進まずに細胞内に留まります。そのため細胞内には内因性G6Pと2DG6Pが含まれている状態になりますが、本キットの第1段階で試料中に含まれる内因性G6Pを分解させた後に、第2段階で細胞内に取り込まれた2DG6P量に比例してNADPHを産生し、酵素サイクリング法で高感度に検出します。

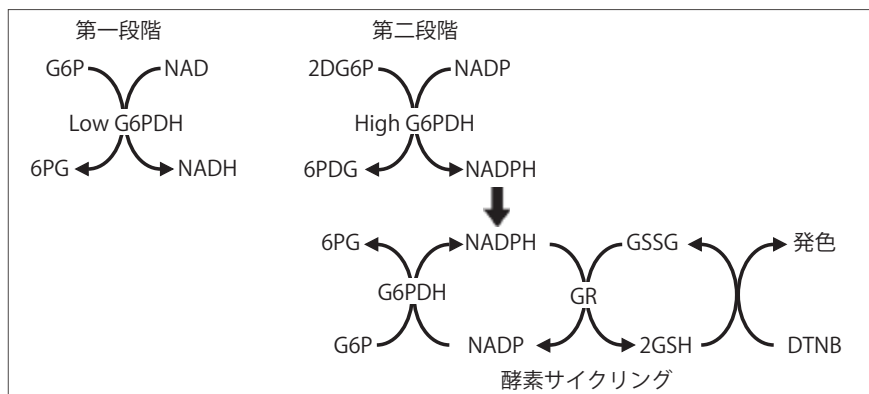


図1 キットの測定原理





## 2-Deoxyglucose (2DG) Uptake Measurement Kit

— 2-デオキシグルコース (2DG) 代謝速度測定キット —

Cat. No. OKP-PMG-K01

[www.cosmobio.co.jp](http://www.cosmobio.co.jp)

## 【1-2】キット構成

本製品は 50 検体を測定できます。

保存温度：-20℃、ただし※印がついている構成は、解凍後 4℃保存してください。

内容	容量	数量	取扱上の注意
反応基質液 A <sup>※</sup> (Solution A)	3,400 μL	1 本	取扱う際には眼鏡・手袋などの保護具を着用の上、人体の接触を避けるよう十分に配慮してください。
反応液 B <sup>※</sup> (Solution B)	1,000 μL	1 本	
反応液 C <sup>※</sup> (Solution C)	1,000 μL	1 本	
反応基質液 D <sup>※</sup> (Solution D)	1,600 μL	1 本	
反応液 E <sup>※</sup> (Solution E)	1,000 μL	1 本	
反応液 F <sup>※</sup> (Solution F)	1,000 μL	1 本	
反応基質液 G <sup>※</sup> (Solution G)	2,000 μL	1 本	
1 mM 2DG6P <sup>※</sup>	500 μL	1 本	
検体希釈原液 <sup>※</sup> (Sample Diluent Buffer Concentrate)	3 mL	1 本	
発色基質液 <sup>※</sup> (Substrate Buffer)	11 mL	1 本	
DTNB (粉末) (DTNB Substrate)	2 mL 分 (10 検体用)	5 本	
Low G6PDH (赤キャップ)	25 μL	1 本	
High G6PDH (黒キャップ)	250 μL	1 本	
GR (青キャップ)	20 μL	1 本	

## 【II - 1】 検体希釈液の調製

- 検体希釈原液を超純水で 100 倍希釈したものを検体希釈液とします。
- 検体希釈液は冷蔵で 3 ヶ月間安定です。

## 【II - 2】 標準液の調製

- 標準液は、1 mM 2DG6P を検体希釈液で希釈します。
- 0  $\mu$ M 2DG6P から 5  $\mu$ M 2DG6P の範囲内で複数の濃度を標準液として用意します。
- 標準液は冷蔵で 1 週間保存可能です。

## 【II - 3】 反応液 A の調製

- 1 検体あたり反応液 A は 60  $\mu$ L 使用します
- 10 検体分の反応液 A の調製は、下表のように混合してください (用時調製、使用時まで氷上保管)。

反応基質液 A	650 $\mu$ L
Low G6PDH ※チューブのキャップは赤色	3 $\mu$ L

※ Low G6PDH のチューブをあける前に、必ずフラッシュ遠心等で壁面に付着した溶液を落としてから使用下さい。

※ Low G6PDH は 50%グリセロールが含まれているため、溶液に粘性があります。

※調製後の反応液 A は、溶液が均一になるように混合して下さい。

## 【II - 4】 反応液 D の調製

- 1 検体あたり反応液 D は 30  $\mu$ L 使用します
- 10 検体分の反応液 D の調製は、下表のように混合してください (用時調製、使用時まで氷上保管)。

反応基質液 D	290 $\mu$ L
High G6PDH ※チューブのキャップは黒色	30 $\mu$ L

※ High G6PDH のチューブをあける前に、必ずフラッシュ遠心等で壁面に付着した溶液を落としてから使用下さい。

※ High G6PDH は 50%グリセロールが含まれているため、溶液に粘性があります。

※調製後の反応液 D は、溶液が均一になるように混合して下さい。

## 【II - 5】 発色液の調製

- 発色基質液と DTNB (粉末) を下表のように混合し、粉末を完全に溶かして発色液を調製します。

DTNB (粉末)	バイアル 1 本
発色基質液	2 mL

- 発色液は、遮光下冷蔵で 7 日間保存可能です。



## 2-Deoxyglucose (2DG) Uptake Measurement Kit

— 2-デオキシグルコース (2DG) 代謝速度測定キット —

Cat. No. OKP-PMG-K01

www.cosmobio.co.jp

## 【II-6】 酵素サイクリング液の調製

- 1 検体あたり酵素サイクリング液は 70  $\mu\text{L}$  使用します。
- 10 検体分の酵素サイクリング液の調製は、下表のように使用直前に混合して使用してください (用時調製、使用時まで氷上保管)。

反応基質液 G	360 $\mu\text{L}$
発色液	360 $\mu\text{L}$
High G6PDH ※チューブのキャップは黒色	10 $\mu\text{L}$
GR ※チューブのキャップは青色	2 $\mu\text{L}$

※ High G6PDH および GR のチューブをあける前に、必ずフラッシュ遠心等で壁面に付着した溶液を落としてから使用下さい。

※ High G6PDH および GR は 50 % グリセロールが含まため、粘性があります。

※調製後の酵素サイクリング液は、溶液が均一に混合されるようにして下さい。

## 【III】 測定方法

測定をおこなう前に下記の注意事項を読んでください。

- 各試薬を添加する前 (蓋をあける前)、各試薬を添加し混合した後は、必ずフラッシュ遠心等で壁面および蓋に付着した液を十分に落として下さい。壁面に試薬が付着した状態で操作を続けた場合、測定結果に大きな誤差が生じますのでご注意ください。
- マイクロプレートでアッセイする場合は、反応中はプレートシール等で密閉状態にしてください。

下記の液量は 1 検体あたりの添加量を記載しています。

- 1 試料または標準液 20  $\mu\text{L}$  に反応液 A 60  $\mu\text{L}$  を混合し、室温 (20 ~ 25 $^{\circ}\text{C}$ ) で一晩 (16 時間以上) 静置してください。試料の調製は、《IV. 糖取込の方法例》をご覧ください。
- 2 反応液 B を 5  $\mu\text{L}$  加えて、十分に混合してください。
- 3 38 $^{\circ}\text{C}$  で 1 時間保温してください。
- 4 反応液 C を 5  $\mu\text{L}$  加えて十分に混合し、室温で 5 ~ 10 分間静置してください。  
※この間に反応液 D を調製してください。
- 5 反応液 D を 30  $\mu\text{L}$  加えて、穏やかに混合してください。
- 6 38 $^{\circ}\text{C}$  で 1 時間保温してください。
- 7 反応液 E を 5  $\mu\text{L}$  加えて、十分に混合してください。
- 8 70 $^{\circ}\text{C}$  で 1 時間保温します。
- 9 反応液を氷上で 5 分程度放置し、反応液を冷却してください。
- 10 反応液 F を 5  $\mu\text{L}$  加えて、十分に混合してください。
- 11 室温で 5 ~ 15 分間静置します。  
※この間に酵素サイクリング液を調製してください。
- 12 酵素サイクリング液 70  $\mu\text{L}$  を同時に加えて、穏やかに混合してください。  
速やかに反応液を、波長 420 nm (もしくは ~ 430 nm) における吸光度変化を室温 (25 ~ 30 $^{\circ}\text{C}$ ) で経時的に測定してください。  
反応液中に含まれる 2DG6P 量に依存して黄色に発色し、反応時間にも比例して発色が進むため、同時に測定できる機器 (マイクロプレートリーダー) で測定することが好ましいです。  
やむを得ずマイクロキュベットを使用した分光光度計で測定する場合は、発色させた反応液に 5 M 塩化ナトリウム溶液を 50  $\mu\text{L}$  同時に添加して発色を停止してください。その後、速やかに吸光度測定してください。

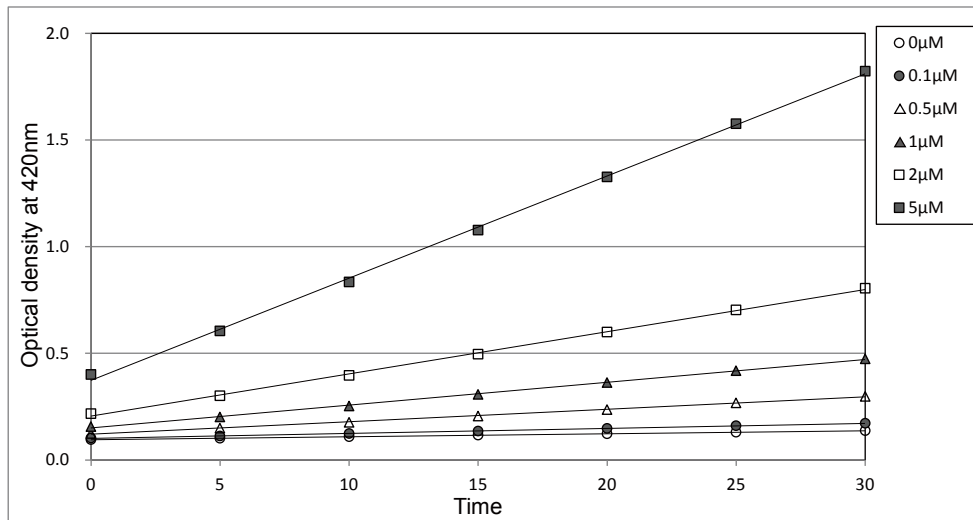


図2 2DG6Pの各濃度における吸光度の経時的変化

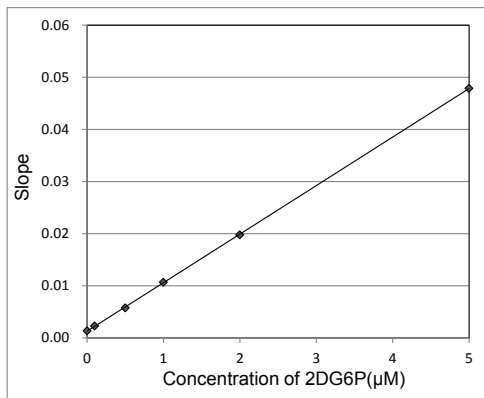


図3 カイネティック法による検量線 (発色後 30 分)

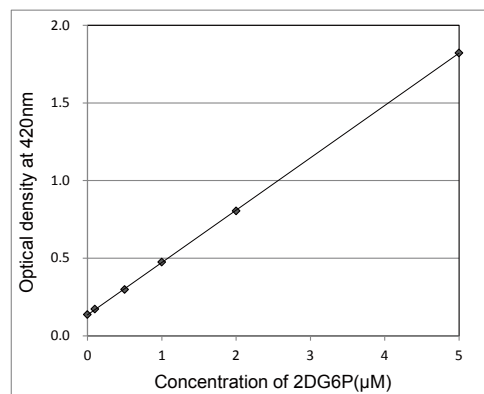


図4 エンドポイント法による検量線 (発色後 30 分)

## 【IV】糖取込の方法例 - 脂肪細胞を用いた糖取込み方法の場合

### 必要な試薬類

- ・ 6 ウェルプレートで培養させた 3T3-L1 細胞などの脂肪細胞
- ・ 無血清培地
- ・ 37°Cに保温した Krebs Ringer Phosphate HEPES(KRPH) バッファー  
(1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 1.3 mM CaCl<sub>2</sub>, 118 mM NaCl, 5 mM KCl, 30 mM HEPES, pH7.5)
- ・ BSA (essentially fatty acid free 及び globulin free グレード、例えば Sigma Ca. No. A0281 同等品を使用)
- ・ 2-Deoxy-D-glucose (2DG) 溶液
- ・ インスリン溶液
- ・ PBS (カルシウム、マグネシウム不含)
- ・ Phloretin (もしくは Cytochalasin B などの糖取込み阻害剤)
- ・ 10 mM Tris-HCl バッファー (pH8.0)

### 方法例

- 1 脂肪分化させた培養細胞を用意してください。
- 2 培地を除去し、無血清培地で 6 時間培養してください。
- 3 KRPH バッファーで 1 ウェルあたり 3 mL 加えて、ウェル内を 3 回洗浄してください。
- 4 2% BSA を含む KRPH バッファーで 1 ウェルあたり 3 mL 加えます。  
※これ以降のインスリン、Phloretin、2DG の添加は、測定目的によって使用してください。
- 5 インスリン溶液を最大 1 μM になるように添加し、37°Cで培養してください。
- 6 Phloretin 溶液は、インスリンを添加してから 16 分後に 200 ~ 1000 μM になるように添加してください。
- 7 2DG 溶液は、インスリンを添加してから 18 分後に 1 mM になるように添加してください。
- 8 2DG を添加し 37°Cで 20 分間培養した後、培養液を除き、冷却した 200 μM Phloretin を含む PBS(カルシウム、マグネシウム不含) でウェル内を 3 回洗浄します。
- 9 1 ウェルあたり 3 mL の 10 mM Tris-HCl バッファー (pH8.0) でチューブに細胞を回収し、直ちに超音波処理によって細胞溶解液 (細胞抽出液) を作成してください。
- 10 細胞抽出液を回収し、80°Cで 15 分間熱処理をおこないます。
- 11 熱処理をおこなった後、冷却遠心 (15,000 x g、20 分間) で上清を回収します。
- 12 回収した上清の一部を検体希釈液で 5 倍またはそれ以上希釈し、その溶液を《III. 測定方法》の試料とします。  
抽出液を保存する場合は冷凍保存してください。  
検体希釈液については《II -1 検体希釈液の調製》をご覧ください。

※ 細胞の抽出液に 2-メルカプトエタノールやジチオスレイトールのような還元剤、プロテアーゼ阻害剤は添加しないでください。

※ 細胞溶解には水酸化ナトリウム溶液を使用できませんので注意してください。

※ 細胞の種類・分化の程度によって、添加濃度や反応時間を調整してください。



2-Deoxyglucose (2DG) Uptake Measurement Kit

— 2-デオキシグルコース (2DG) 代謝速度測定キット —

Cat. No. OKP-PMG-K01

実施例

3T3-L1 細胞の培養は、方法例に従い下記のスケジュールにて行った。3T3-L1 細胞を抽出し測定した結果を図 5 に示します (※一測定例になります)。

添加物	Sample A	Sample B	Sample C	Sample D
インスリン	-	-	-	+
2DG	-	+	+	+
Phloretin	-	-	+	-

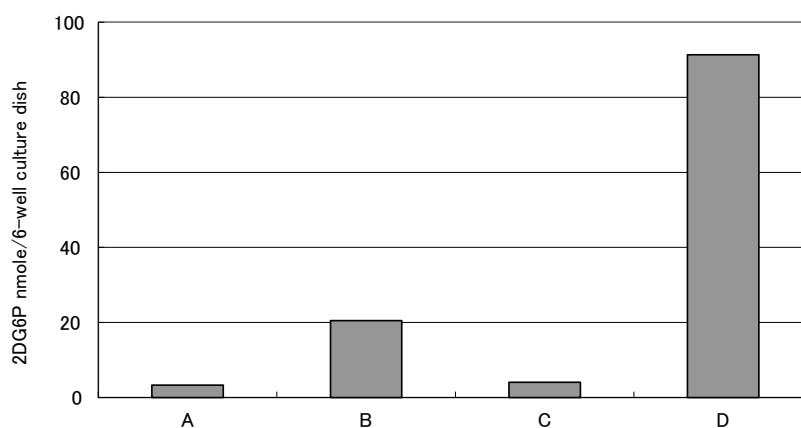


図 5 測定結果



## 2-Deoxyglucose (2DG) Uptake Measurement Kit

— 2-デオキシグルコース (2DG) 代謝速度測定キット —

Cat. No. OKP-PMG-K01

**【V】参考文献**

- (1) Monden M, et. al., Diabetes. 2013 Feb;62(2):478-89. PMID : 23011593
- (2) Wang X, et. al., Diabetes. 2013 Feb;62(2):444-56. PMID : 23086038
- (3) Woo MS, et .al., Phytother Res. 2013 Jul;27(7):1102-5. PMID : 22991308
- (4) Saito K, et.al., Anal Biochem. 2011 May 1;412(1):9-17. PMID : 21262191
- (5) Bo M. Jørgensen, et. al., Anal Biochem. 1979 Nov 1;99(2):297-303

(1)～(3)はキットを使用した論文です。

(4)、(5)はキットの原理が記載されている論文です。

