

果糖-1,6-二磷酸（FDP）含量检测试剂盒说明书

微量法

注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。

货号：AC10409

规格：100T/48S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系本公司工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液一	液体 60 mL×1 瓶	4°C保存
提取液二	液体 10 mL×1 瓶	4°C保存
试剂一	液体 10 mL×1 瓶	4°C保存
试剂二	粉剂×1 支	4°C保存
试剂三	液体 7 mL×1 瓶	4°C保存
试剂四	液体 20 mL×1 瓶	4°C保存
标准品	粉剂×1 支	4°C保存

溶液的配制：

- 1、试剂二：临用前加入 0.3mL 蒸馏水，充分溶解后待用，用不完的试剂 4°C保存，4°C保存一周；
- 2、标准品：临用前加入 1176 μ L 蒸馏水充分溶解，配制成 50 μ mol/mL 果糖-1,6-二磷酸标准溶液。

产品说明：

果糖 1,6-二磷酸（fructose-1,6-diphosphate, FDP）是糖酵解过程中的一种重要的中间产物，对多种酶具有调节作用，具有改善细胞能量代谢、增加能量利用、抗心律失常及抗组织过氧化等作用，广泛应用于临床医药。

醛缩酶催化果糖 1,6-二磷酸裂解，产物与 2,4-二硝基苯肼在酸性介质中反应生成 2,4-二硝基苯腙，在碱性溶液中呈红棕色，在 540nm 处有特征吸收峰。

注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计/酶标仪、低温台式离心机、水浴锅/恒温培养箱、微量玻璃比色皿/96孔板、可调式移液枪、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水、EP管。

操作步骤：

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

1. 组织：按照质量（g）：提取液一体积（mL）为1：5~10的比例（建议称取约0.1g，加入1mL提取液一）加入提取液一，冰浴匀浆后于4°C，12000g离心10min，取0.8mL上清液，再加入0.16mL提取液二，4°C，12000g离心10min后取上清待测。
2. 细胞：按照细胞数量（ 10^4 个）：提取液一（mL）为500~1000：1的比例（建议500万细胞加入1mL提取液一）加入提取液一，冰浴超声波破碎细胞（功率300w，超声3秒，间隔7秒，总时间3min）；于4°C，12000g离心10min，取0.8mL上清液，再加入0.16mL提取液二，4°C，12000g离心10min后取上清待测。

3. 血清（浆）：取100 μ L血清（浆）加入1mL提取液一，4 $^{\circ}$ C，12000g离心10min，取0.8mL上清液，再加入0.16mL提取液二，4 $^{\circ}$ C，12000g离心10min后取上清待测。

二、测定步骤

- 1、分光光度计/酶标仪预热30min以上，调节波长至540nm，蒸馏水调零。
- 2、将50 μ mol/mL的果糖-1,6-二磷酸标准液用蒸馏水倍比稀释为3.125、1.5625、0.78125、0.39、0.2、0.1 μ mol/mL的标准溶液备用。
- 3、样本测定：（在1.5 mL离心管或96孔板中操作）

试剂名称（ μ L）	对照管	测定管	空白管	标准管
样本	20	20	-	-
蒸馏水	-	-	20	-
标准溶液	-	-	-	20
试剂一	44	40	44	40
试剂二	-	4	-	4
充分混匀，37 $^{\circ}$ C准确反应2 h				
试剂三	40	40	40	40
充分混匀，37 $^{\circ}$ C准确反应20 min				
试剂四	100	100	100	100
充分混匀，37 $^{\circ}$ C准确反应10 min				
于微量玻璃比色皿/96孔板中测定540nm处吸光值A，分别记为A对照管、A测定管、A空白管和A标准管。计算 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}$ 。（空白需检测1-2次）				

三、FDA 含量计算

1、标准曲线的绘制：

以各个标准溶液的浓度为 x 轴，其对应的 ΔA 标准为 y 轴，绘制标准曲线，得到标准方程 $y = kx + b$ ，将 ΔA 带入方程得到 x（ μ mol/mL）。

2、FDP 含量的计算：

（1）按样本质量计算

$$\text{FDP 含量} (\mu\text{g/g 质量}) = x \times (V_{\text{上清}} + V_{\text{提取液二}}) \times M \div (W \times V_{\text{上清}} \div V_{\text{提取液一}}) = 408x \div W$$

（2）按细胞数量计算

$$\begin{aligned} \text{FDP 含量} (\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) &= x \times (V_{\text{上清}} + V_{\text{提取液二}}) \times M \div (V_{\text{上清}} \div V_{\text{提取液一}} \times \text{细胞数量}(\text{万个})) \\ &= 408x \div \text{细胞数量} (\text{万个}) \end{aligned}$$

（3）按液体体积计算

$$\text{FDP 含量} (\mu\text{mol/mL}) = x \times (V_{\text{上清}} + V_{\text{提取液二}}) \div [V_{\text{液体}} \times V_{\text{上清}} \div (V_{\text{提取液一}} + V_{\text{液体}})] = 13.2x$$

V 上清：提取时上清液体积，0.8mL；V 提取液二：提取液二的体积，0.16mL；V 提取液一：提取液一的体积，1mL；

W：样本质量，g；M：果糖-1,6-二磷酸分子质量，340；V 液体：液体样本体积，0.1mL。

注意事项：

当 ΔA 测定大于0.5时，建议将样本用蒸馏水稀释后再进行测定，计算公式中乘以稀释倍数。