



## 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：BC2245

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，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。**

试剂名称	规格	保存条件
提取液一	液体 60 mL×1 瓶	2-8℃保存
提取液二	液体 10 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 10 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	液体×2 支	2-8℃保存
试剂三	液体 7 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂四	液体 15 mL×1 瓶	2-8℃保存
标准品	粉剂×1 支	2-8℃保存

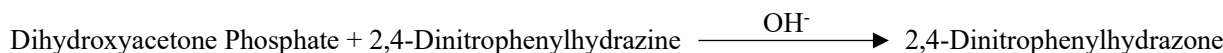
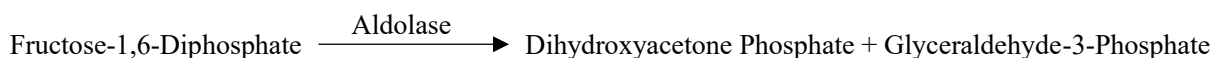
溶液的配制：

- 1、试剂二：临用前取一支加入 0.15 mL 蒸馏水，充分溶解后待用，用不完的试剂-20℃分装保存 4 周，避免反复冻融；
- 2、标准品：临用前加入 1176 μL 蒸馏水充分溶解，配制成 50 μmol/mL 果糖-1,6-二磷酸标准溶液，2-8℃可以保存 4 周。

### 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 540 nm 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/细胞超声破碎仪、冰、蒸馏水和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℃，12000g离心10min，取0.8mL上清液，再缓慢加入0.15mL提取液二，缓慢吹打混匀至无气泡产生，4℃ 12000g离心10min后取上清待测。
2. 细胞：按照细胞数量（10<sup>4</sup>个）：提取液一体积（mL）为500~1000：1的比例（建议500万细胞加入1mL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℃，12000g离心10min，取0.8mL上清液，再缓慢加入0.15mL提取液二，缓慢吹打混匀至无气泡产生，4℃ 12000g离心10min后取上清待测。
3. 血清（浆）等液体：取100μL液体加入1mL提取液一，4℃ 12000g离心10min，取0.8mL上清液，再缓慢加入0.15mL提取液二，缓慢吹打混匀至无气泡产生，4℃ 12000g离心10min后取上清待测。

注：试剂二需缓慢加入，加入后会产生大量气泡，建议使用2mL EP管进行操作。

## 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，分光光度计蒸馏水调零。
- 2、将50μmol/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 μmol/mL的标准溶液备用。
- 3、标准品稀释表：

序号	稀释前浓度（μmol/mL）	标准液体积（μL）	蒸馏水体积（μL）	稀释后浓度 μmol/mL）
1	50	30	930	1.5625
2	1.5625	200	200	0.78125
3	0.78125	200	200	0.39
4	0.39	200	200	0.2
5	0.2	200	200	0.1

实验中每个标准管需40μL标准溶液。

- 4、样本测定：（在1.5 mL离心管或96孔板中操作）

试剂名称（μL）	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℃准确反应2 h				
试剂三	40	40	40	40
充分混匀，37℃准确反应20 min				
试剂四	100	100	100	100
充分混匀，37℃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ΔA=A测定管-A对照管，ΔA标准=A标准管-A空白管。（空白管和标曲只需检测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 代入方程得到 x (μmol/mL)。

2、FDP 含量的计算：

(1) 按样本质量计算

$$\text{FDP 含量 } (\mu\text{g/g 质量}) = x \times (V_{\text{上清}} + V_{\text{提取液二}}) \times M \div (W \times V_{\text{上清}} \div V_{\text{提取液一}}) = 403.75x \div W$$

(2) 按细胞数量计算

$$\text{FDP 含量 } (\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) = x \times (V_{\text{上清}} + V_{\text{提取液二}}) \times M \div (V_{\text{上清}} \div V_{\text{提取液一}} \times N) = 403.75x \div N$$

(3) 按液体体积计算

$$\text{FDP 含量 } (\mu\text{g/mL}) = x \times (V_{\text{上清}} + V_{\text{提取液二}}) \times M \div [V_{\text{液体}} \times V_{\text{上清}} \div (V_{\text{提取液一}} + V_{\text{液体}})] = 4441.25x$$

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，0.15mL；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；N：细胞数量，以万计。

**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。

**相关系列产品：**

BC2270/BC2275 果糖-1,6-二磷酸醛缩酶（FBA）活性检测试剂盒

BC2250/BC2255 3-磷酸甘油酸激酶（PGK）活性检测试剂盒