

果糖-1,6-二磷酸（FDP）含量检测试剂盒说明书

紫外分光光度法

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：BC2240

规格：50T/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 30 mL×1 瓶	-20℃保存
试剂二	粉剂×1 支	-20℃保存
试剂三	液体 40 μL×1 瓶	2-8℃保存
试剂四	液体 280 μL×1 瓶	2-8℃保存
试剂五	液体 61 μL×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：临用前加入 8mL 蒸馏水充分溶解，用不完的试剂分装后-20℃保存 4 周，禁止反复冻融；
- 2、试剂三：液体置于试剂瓶内 EP 管中，使用前离心至底部。临用前加入 7mL 蒸馏水充分溶解，用不完的试剂分装后-20℃保存 4 周，禁止反复冻融；
- 3、试剂四：液体置于试剂瓶内 EP 管中，使用前离心至底部。临用前加入 7mL 蒸馏水充分溶解，用不完的试剂分装后-20℃保存 4 周，禁止反复冻融；
- 4、试剂五：临用前加入 1.85mL 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；
- 5、标准品：临用前加入 1176μL 蒸馏水充分溶解，配制成 50μmol/mL 果糖-1,6-二磷酸标准品，2-8℃保存 4 周。

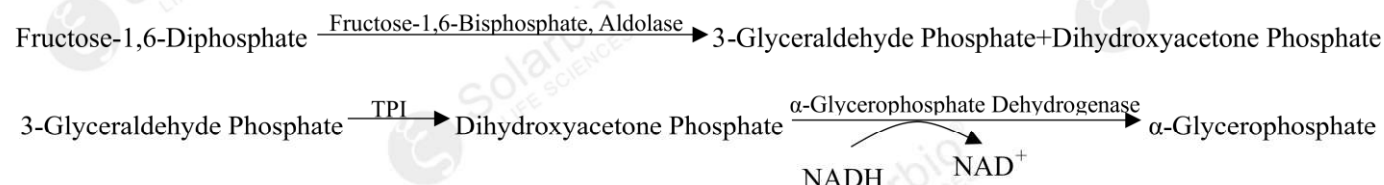
注：（1）溶液配制处的离心使用掌上离心机甩离即可；

（2）试剂三、试剂四、试剂五液体体积小，可能会由于液体贴壁导致无法再次吸取足够体积，不影响使用；直接加入蒸馏水溶解即可。

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 1,6-二磷酸生成 3-磷酸甘油醛和磷酸二羟丙酮，在磷酸丙糖异构酶和 α-磷酸甘油脱氢酶作用下催化 NADH 和磷酸二羟丙酮生成 NAD⁺ 和 α-磷酸甘油，引起 340nm 处吸光度下降。通过测定 NADH 的变化，计算果糖 1,6-二磷酸的含量。





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：

紫外分光光度计、天平、低温台式离心机、水浴锅/恒温培养箱、1mL石英比色皿、可调式移液枪、研钵/匀浆器/细胞超声破碎仪、漩涡振荡仪、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（10⁶个）：提取液一体积（mL）为5~10：1的比例（建议5×10⁶细胞加入0.5mL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0.4mL上清液，再缓慢加入0.075mL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0.5mL液体加入0.5mL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：提取液二需缓慢加入，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、分光光度计预热30min 以上，调节波长至340nm，蒸馏水调零。
- 2、根据样本量取部分试剂一37℃预热10min。
- 3、将50μmol/mL的果糖-1,6-二磷酸标准品用蒸馏水稀释为0.4、0.2、0.1、0.05、0.025、0μmol/mL的标准品备用。
- 4、标准品稀释表：

序号	稀释前浓度（μmol/mL）	标准品体积（μL）	蒸馏水体积（μL）	稀释后浓度 μmol/mL）
1	50	16	984	0.8
2	0.8	400	400	0.4
3	0.4	400	400	0.2
4	0.2	400	400	0.1
5	0.1	400	400	0.05
6	0.05	400	400	0.025

备注：下述实验中每个标准管需250μL标准品（注意不要在此步骤直接检测标准品吸光度）。

5、样本测定：（在1mL石英比色皿中操作）

试剂名称（μL）	测定管	空白管	标准管
样本	250	-	-
蒸馏水	-	250	-
标准品	-	-	250
试剂一	425	425	425
试剂二	100	100	100



试剂三	100	100	100
试剂四	100	100	100
试剂五	25	25	25

充分混匀后于340nm处测定10s时的吸光值A1，迅速置于37℃水浴10min，拿出迅速擦干测定10min10s时的吸光值A2，分别记为A1测定、A2测定、A1标准、A2标准、A1空白和A2空白。计算ΔA标准=(A1标准-A2标准)-(A1空白-A2空白)，ΔA测定=(A1测定-A2测定)-(A1空白-A2空白)。(标准曲线和空白管只需测1-2次。)

注意：若样本量过多，可根据样本量按试剂一：试剂二：试剂三：试剂四：试剂五=425μL：100μL：100μL：100μL：25μL（共750μL，约1T）的比例混成工作液后使用，注意现配现用。

三、FDP 含量计算

1、标准曲线的绘制：

以各个标准品的浓度为 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 测定带入方程得到 x (μmol/mL)。

2、FDP 含量的计算：

(1) 按蛋白浓度计算

$$\text{FDP 含量} (\mu\text{mol}/\text{mg prot}) = x \times V_{\text{样}} \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) = x \div \text{Cpr}$$

(2) 按样本质量计算

$$\text{FDP 含量} (\mu\text{mol}/\text{g 质量}) = x \times (V_{\text{上清}} + V_{\text{提取液二}}) \div (W \times V_{\text{上清}} \div V_{\text{提取液一}}) = 1.1875x \div W \times F$$

(3) 按液体体积计算

$$\text{FDP 含量} (\mu\text{mol}/\text{mL}) = x \times (V_{\text{上清}} + V_{\text{提取液二}}) \div [V_{\text{液体}} \times V_{\text{上清}} \div (V_{\text{液体提取液一}} + V_{\text{液体}})] = 2.375x \times F$$

V 样：操作表中加入的样本体积，0.25mL；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；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；W：样本质量，g；V 液体提取液一：液体样本提取液一的体积，0.5mL；V 液体：液体样本体积，0.5mL；F：稀释倍数。

(4) 按细胞数量计算

$$\text{FDP 含量} (\mu\text{mol}/10^6 \text{ cell}) = x \times (V_{\text{上清}} + V_{\text{提取液二}}) \div (V_{\text{上清}} \div V_{\text{提取液一}} \times N) \times F = 0.594x \div N \times F$$

V 样：加入的样本体积，0.25mL；V 上清：提取时上清液体积，0.4mL；V 提取液二：提取液二的体积，0.075mL；V 提取液一：提取液一的体积，0.5mL；N：细胞数量，以百万计；F：稀释倍数。

注意事项：

- 1、提取液一中含有蛋白质沉淀剂，因此上清液不能用于蛋白浓度测定。如需测定蛋白浓度，需另取组织。
- 2、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，若 ΔA 测定过小可增大样本量或延长反应时间至 30min 或更长时间，注意同步修改计算公式。

实验实例：

- 1、取 0.121g 猕猴桃加入 1mL 提取液一进行冰浴匀浆，取 0.8mL 上清后缓慢加入 0.15mL 提取液二，离心后取上清液，按照测定步骤操作，用 1mL 石英比色皿测得 ΔA 测定=(A1 测定-A2 测定)-(A1 空白-A2 空白)=(1.315-1.173)-(0.997-0.926)=0.071，带入标曲 $y=1.5231x-0.0275$ ， $R^2=0.9921$ ，计算 $x=0.065$ ，按样本质量计算 FDP 含量得：





FDP 含量 ($\mu\text{mol/g}$ 质量) $= 1.1875x \div W \times F = 0.638 \mu\text{mol/g}$ 质量。

- 2、取 0.104g 大鼠心脏加入 1mL 提取液一进行冰浴匀浆，取 0.8mL 上清后缓慢加入 0.15mL 提取液二，离心后取上清液，按照测定步骤操作，用 1mL 石英比色皿测得 ΔA 测定 $= (A1 \text{ 测定} - A2 \text{ 测定}) - (A1 \text{ 空白} - A2 \text{ 空白}) = (1.244 - 1.141) - (0.997 - 0.926) = 0.032$ ，带入标曲 $y = 1.5231x - 0.0275$ ， $R^2 = 0.9921$ ，计算 $x = 0.039$ ，按样本质量计算 FDP 含量得：

FDP 含量 ($\mu\text{mol/g}$ 质量) $= 1.1875x \div W \times F = 0.445 \mu\text{mol/g}$ 质量

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

