

1,6-二磷酸-果糖(FDP)含量试剂盒说明书

(货号:BP10001F 紫外法 48 样 有效期: 3 个月)

一、指标介绍:

1,6-二磷酸果糖 (FDP) 是糖酵解过程中的中间产物, 具有调节糖代谢中某些酶活性的功能, 为恢复、改善细胞代谢的分子水平药物, 广泛应用于医药、保健、美容等行业。

本试剂盒提供一种简单, 灵敏, 快速的测定方法: 1,6-二磷酸果糖 (FDP)在醛缩酶(ALD)和磷酸甘油醛异构酶(TIM)的作用下生成磷酸两分子二羟丙酮(DAP), DAP 在 3-磷酸甘油脱氢酶 (GDH) 作用下能将 NADH 氧化, 通过检测 NADH 在 340nm 处的下降量, 进而计算得出 1,6-二磷酸果糖 (FDP)含量。

二、试剂盒组成和配制:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 60mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉体 4 支	-20℃保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部(可手动甩一甩); 2. 加入 0.55mL 蒸馏水溶解备用。用不完的液体试剂分装后-20℃保存, 禁止反复冻融, 一周内用完。
试剂二	液体μL×1 支	-20℃保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底; 2. 加入 1.1mL 蒸馏水溶解备用。用不完的液体试剂分装后-20℃保存, 禁止反复冻融。
试剂三	液体 30mL×1 瓶	4℃保存	
试剂四	液体 1 支	-20℃保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底; 2. 加入 1.1mL 蒸馏水溶解备用。用不完的液体试剂分装后-20℃保存, 禁止反复冻融。
标准品	液体 1 支	4℃保存	使用方法: 1. 该标准品 (FDP) 浓度为 10μmol/mL, 用前再用蒸馏水稀释 20 倍成 0.5μmol/mL 备用; 按照加样表中的测定管操作 (样本更换成备用浓度的标准品); 2. 仅用来鉴定试剂盒中试剂是否正常 (不参与结果计算)。

三、实验器材:

研钵 (匀浆机)、冰盒 (制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅 (烘箱、培养箱、金属浴)、1ml 石英比色皿、离心管、紫外分光光度计、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本 (例如不同类型或分组) 进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

1、样本提取

① 组织样本:

建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆。12000rpm, 4℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可以按照组织质量 (g): 提取液体积(mL)为 1: 5~10 的比例提取。

② 细菌/细胞样本：

先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；取约 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液，超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；12000rpm 4℃ 离心 10min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照细菌/细胞数量（10⁴）：提取液（mL）为 500~1000：1 的比例进行提取。

③ 液体样本：直接检测。若浑浊，离心后取上清检测。

2、检测步骤：

① 紫外分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 340nm，蒸馏水调零。

② 试剂解冻至室温（25℃），或可放在 25℃ 条件下水浴 5-15min。

③ 试剂一和二和三可按照 40:20:580 比例配成混合液（一枪加 640μL 该混合液）（该混合液用多少配多少，现配现用）。

④ 在 1mL 石英比色皿（光径 1cm）按照下表依次加入试剂：

试剂组分（μL）	测定管
样本	80
试剂一	40
试剂二	20
试剂三	580
轻轻混匀，室温（25℃）于 340nm 处测定，15min 后读取 A1。	
试剂四	20
轻轻混匀，室温（25℃）于 340nm 处测定，20min 后读取 A2(直到 2min 内 A2 值变化小于 0.02)。 $\Delta A = A1 - A2$ 。	

【注】：1. 测定管的 A1 值若超过 2（如样本自身颜色较深），可把样本用蒸馏水稀释后再检测，稀释倍数 D 代入计算公式。

2. 若 ΔA 的差值在零附近徘徊，可增加样本量 V1（如增至 120μL，则试剂三相应减少，保持总体积不变），或增加样本取样质量 W，则改变后的 V1 和 W 需代入公式重新计算。

3. 若 ΔA 的差值大于 0.4，须减少样本量 V1（如减至 40μL，则试剂三相应增加，保持总体积不变），则改变后的 V1 需代入公式重新计算。

五、结果计算：

1、按样本重量计算：

$$\text{FDP 含量}(\text{mg/g 鲜重}) = [(\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^3 \times \text{Mr}) \div (W \times V1 \div V) \div 2 \times D = 0.253 \times \Delta A \div W \times D$$

2、按细胞数量计算：

$$\text{FDP 含量}(\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^6 \times \text{Mr}) \div (500 \times V1 \div V) \div 2 \times D = 0.51 \times \Delta A \times D$$

3、按照液体体积计算：

$$\text{FDP 含量}(\text{mg/mL}) = [(\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^3 \times \text{Mr}) \div V1 \times D \div 2 = 0.253 \times \Delta A \times D$$

4、按样蛋白浓度计算：

$$\text{FDP 含量}(\text{mg/mg prot}) = [(\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^3 \times \text{Mr}) \div (\text{Cpr} \times V1 \div V) \div 2 \times D = 0.253 \times \Delta A \div \text{Cpr} \times D$$

ϵ ---NADH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$ ；

d---光径，1cm；

V---加入提取液体积，1 mL；

V1---加入样本体积，0.08mL；

V2---反应总体积， $0.74 \text{ mL} = 7.4 \times 10^{-4} \text{ L}$ ；

W---样本质量，g；

Mr---1,6-二磷酸果糖 (FDP)分子量; 340.06; 500---细胞数量, 万;
2---1 分子 FDP 生成 2 分子二羟丙酮;
Cpr---蛋白浓度 (mg/mL) ; 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。