

Fructose-1,6-Diphosphate Content Assay Kit

1,6-二磷酸-果糖(FDP)含量试剂盒说明书

货号:BN72004| 方法: 紫外分光法 | 规格: 48 样

一、产品简介:

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, 进而计算出 1,6-二磷酸果糖 (FDP)含量。

二、试剂盒组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 60mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉体 mg×4 支	-20℃保存	使用前甩几下或离心使试剂落入底部, 每支再加 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	使用前甩几下或离心使试剂落入底部, 再加 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μL×1 支	4℃保存	使用前甩几下或离心使试剂落入底部, 再加 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 mL×1 支	4℃保存	仅用来鉴定试剂盒中试剂是否正常 (不参与结果计算)。 使用方法: 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)。

三、所需的仪器和用品:

紫外分光光度计、1mL 石英比色皿 (光径 1cm)、台式离心机、可调式移液器、研钵、水浴锅、冰和蒸馏水。

四、1,6-二磷酸果糖 (FDP)含量测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

1、样本制备

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、上机检测：

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：

试剂名称（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)。 ΔA=A1-A2。	

注意：本操作流程适用于绝大多数常规样本检测，实验条件可根据实际样本状态适度微调；
针对特殊类型样本，我司技术支持可提供专属优化建议。

五、结果计算：

1、按样本重量计算：

$$\text{FDP 含量(mg/g 鲜重)} = [(\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times 10^3 \times \text{Mr}) \div (W \times V_1 \div V) \div 2 \times D = 0.253 \times \Delta A \div W \times D$$

2、按细胞数量计算：

$$\text{FDP 含量}(\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times 10^6 \times \text{Mr}) \div (500 \times V_1 \div V) \div 2 \times D = 0.51 \times \Delta A \times D$$

3、按照液体体积计算：

$$\text{FDP 含量(mg/mL)} = [(\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times 10^3 \times \text{Mr}) \div V_1 \times D \div 2 = 0.253 \times \Delta A \times D$$

ε---NADH 摩尔消光系数，6.22×10³ 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；0.74mL=7.4×10⁻⁴L；

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。