

果糖-1,6-二磷酸 (Fructose-1,6 Diphosphate, FDP) 试剂盒说明书

微量法 100T/96S

注 意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

测定意义：

果糖 1,6-二磷酸是机体内的高能代谢物和代谢调控剂，是糖酵解途径的重要中间体，广泛存在于动植物和微生物体内，能影响细胞内钾离子的浓度，改善葡萄糖和其他能量底物的代谢，促进组织氧的释放，广泛应用于临床医药制剂。

测定原理：

醛缩酶催化果糖 1,6-二磷酸降解，产物与 DNPH 缩合成紫红色物质，在 540nm 有特征吸收峰。

自备实验用品及仪器：

天平、低温离心机、研钵、恒温水浴锅、可见分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔板。

试剂组成和配制：

试剂一：液体 110mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂二：液体 0.4mL×1 支，4℃ 避光保存。

试剂三：液体 4mL×1 瓶，4℃ 避光保存。

试剂四：液体 16mL×1 瓶，4℃ 保存。

样品处理：

1. 组织：按照质量 (g)：试剂一体积(mL)为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g，加入 1mL 试剂一）加入试剂一，冰浴匀浆后于 4℃，10000g 离心 10min，取上清待测。
2. 细胞：按照细胞数量 (10⁴ 个)：试剂一体积 (mL) 为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细胞加入 1mL 试剂一），冰浴超声波破碎细胞（功率 300w，超声 3 秒，间隔 7 秒，总时间 3min）；然后 4℃，10000g 离心 10min，取上清待测。
3. 液体：直接检测。

测定操作：

	对照管	测定管
样品 (μL)		20
蒸馏水 (μL)	20	
试剂一 (μL)	44	40
试剂二 (μL)		4
充分混匀，37℃ 反应 30min		
试剂三 (μL)	40	40
充分混匀，37℃ 温育 10min		

试剂四 (μL)	160	160
充分混匀, 于 37°C 温育 10min, 于微量石英比色皿/96 孔板, 蒸馏水调零, 测定 540nm 处吸光值, 记为 A 对照管和 A 测定管, $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$, 对照管只要做一管。		

计算公式:

a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

标准曲线: $y = 0.6971x + 0.0012$, $R^2 = 0.9983$

1. 按照质量计算

$$\begin{aligned} \text{FDP (mg/g 鲜重)} &= (\Delta A - 0.0012) \div 0.6971 \div (W \div V \text{ 样总}) \\ &= 1.43 \times (\Delta A - 0.0012) \div W \end{aligned}$$

2. 按照细胞数量计算

$$\begin{aligned} \text{FDP (mg/10}^4 \text{ cell)} &= (\Delta A - 0.0012) \div 0.6971 \div (\text{细胞数量} \div V \text{ 样总}) \\ &= 1.43 \times (\Delta A - 0.0012) \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

3. 按照液体体积计算

$$\begin{aligned} \text{FDP (mg/mL)} &= (\Delta A - 0.0012) \div 0.6971 \\ &= 1.43 \times (\Delta A - 0.0012) \end{aligned}$$

W: 样本质量, g; V 样总: 加入提取液体积, 1mL

b. 用 96 孔板测定的计算公式如下

标准曲线: $y = 0.3486x + 0.0012$, $R^2 = 0.9983$

1. 按照质量计算

$$\begin{aligned} \text{FDP (mg/g 鲜重)} &= (\Delta A - 0.0012) \div 0.3486 \div (W \div V \text{ 样总}) \\ &= 2.87 \times (\Delta A - 0.0012) \div W \end{aligned}$$

2. 按照细胞数量计算

$$\begin{aligned} \text{FDP (mg/10}^4 \text{ cell)} &= (\Delta A - 0.0012) \div 0.3486 \div (\text{细胞数量} \div V \text{ 样总}) \\ &= 2.87 \times (\Delta A - 0.0012) \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

3. 按照液体体积计算

$$\begin{aligned} \text{FDP (mg/mL)} &= (\Delta A - 0.0012) \div 0.3486 \\ &= 2.87 \times (\Delta A - 0.0012) \end{aligned}$$

W: 样本质量, g; V 样总: 加入提取液体积, 1mL

注意事项:

最低检出限为 1.72 mg/L。