

果糖 (Fructose) 含量检测试剂盒说明书

(货号: ADS-W-TDX042 微板法 96 样)

一、产品简介:

果糖是一种常见的己酮糖,是葡萄糖的同分异构体,以游离状态大量存在于水果的浆汁和蜂蜜中。本试剂盒提供一种定量、快速、简单、灵敏的检测果糖含量方法,果糖经特异性酶作用后转化为葡萄糖,葡萄糖在己糖激酶等酶复合物作用下,使NADPH的量不断增加,通过检测340nm下该物质的增加量,进而计算得到果糖含量。

二、试剂盒组分与配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
试剂一	粉剂 1 支	-20°C保存	临用前甩几下或离心,使粉剂落入底部,再加 1.1mL 蒸馏水备用。
试剂二	25mL 液体×1 瓶	4°C保存	
试剂三	粉剂 1 支	-20°C保存	临用前甩几下或离心,使粉剂落入底部,再加 1.1mL 蒸馏水备用。
试剂四	液体 1 支	-20°C保存	临用前甩几下或离心,使微量液体落入底部,再加 1.1mL 蒸馏水备用。

三、所需仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、天平、可调式移液器、研钵、离心机、蒸馏水。

四、果糖含量检测:

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:** 0.1g 组织样本(水分充足的样本建议取 0.2g 左右),加 1mL 的蒸馏水研磨,粗提液全部转移到 EP 管中,12000rpm,常温离心 10min,上清液待测。注:若组织样本蛋白含量很高,可先进行脱蛋白处理。

【注】:做实验前可以选取几个样本,找出适合本次检测样本的稀释倍数 D,果实样本含糖量较高,可稀释 20-40 倍;叶片样本可稀释 2-5 倍。

- ② **细胞样本:** 先收集细胞到离心管内,离心后弃上清;取约 500 万细胞加入 1mL 蒸馏水或 PBS 或生理盐水,超声波破碎细胞(冰浴,功率 200W,超声 3s,间隔 10s,重复 30 次);12000rpm,常温离心 10min,取上清,置冰上待测。

【注】:若增加样本量,可按照细胞数量(10^4):提取液(mL)为 500~1000:1 的比例进行提取。

- ③ **液体样品:** 近似中性的澄清液体样本可直接检测;若为酸性样本则需先用 NaOH(2M)调 PH 值约 7.4,然后室温静置 30min,取澄清液体直接检测。

【注】可选取几个样本,进行不同倍数的稀释,选取适合本次样本的稀释倍数 D。

2、上机检测:

- ① 酶标仪预热 30min,设置温度在 25°C,设定波长到 340nm。
- ② 在 96 孔板中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管	空白管 (仅做一次)
样本	10	
试剂一	10	10
试剂二	160	170
试剂三	10	10
混匀, 反应20min于340nm处读取各管的A1值 (若A值继续增加, 需延长反应时间, 直至2分钟内的吸光值保持不变)		
试剂四	10	10
混匀, 反应20min于340nm处读取各管的A2值 (若A值继续增加, 需延长反应时间, 直至2分钟内的吸光值保持不变), $\Delta A = (A2 - A1)$ 测定 - $(A2 - A1)$ 空白。		

【注】1. 检测反应20min后是否反应完全, 在准备读值时可改用时间扫描: 3min, 间隔1min, 依此判读反应是否完全。然后再读取各测定管的A值。

2. 若A2值超过1.5, 可以减少样本加样量: 如5 μL , 则试剂二相应增加; 或对样本进行稀释, 稀释倍数D代入计算公式计算。

3. 若 ΔA 的差值较小, 可增加样本量: 如50 μL , 则试剂二相应减少。

五、结果计算:

1、按照质量计算:

$$\text{果糖含量}(\text{mg/g 鲜重}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times Mr \times 10^3] \div (W \times V1 \div V) \times D = 1.1439 \times \Delta A \div W \times D$$

2、按照细胞数量计算:

$$\text{果糖含量}(\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times Mr \times 10^6] \div (500 \times V1 \div V) \times D = 1143.9 \times \Delta A \div 500 \times D$$

3、按照体积计算:

$$\text{果糖含量}(\text{mg/mL}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times Mr \times 10^3] \div V1 \times D = 1.1439 \times \Delta A \times D$$

ϵ --- NADPH 的摩尔消光系数, $6.3 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$;

d --- 0.5cm;

V --- 加入提取液体积, 1mL;

$V1$ --- 加入样本体积, 0.01mL; $V2$ --- 反应

总体积, $2 \times 10^4 \text{ L}$;

Mr --- 果糖分子量, 180.16;

W --- 样本鲜重, g;

500 --- 细胞数量, 万;

D --- 稀释倍数, 未稀释即为 1。