

蔗糖-葡萄糖-果糖含量（己糖激酶法）测定试剂盒说明书

（货号：ADS-W-DF018 微板法 96 样 有效期：3 个月）

一、指标介绍：

在大多数植物、水果和食品中发现蔗糖，葡萄糖和果糖。蔗糖和果糖在特异性酶的作用下转化为葡萄糖，葡萄糖在己糖激酶等酶复合物作用下，同时使 NADP 还原成 NADPH，通过检测 340nm 下 NADPH 的增加量，分别计算得到蔗糖、葡萄糖和果糖的含量。

二、测试盒组成和配制：

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
试剂一	粉剂×1 支	4℃保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底（可手动甩一甩）； 2. 加入 1mL 蒸馏水可分装冻存，防止反复冻融； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂二	粉剂 1 瓶	-20℃保存	1. 开盖前注意使粉剂落入底部（可手动甩一甩）； 2. 加入 2.1mL 蒸馏水溶解备用； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂三	35mL 液体×1 瓶	4℃保存	
试剂四	粉剂 2 支	-20℃保存	每支： 1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底（可手动甩一甩）； 2. 每支再加 1.1mL 蒸馏水溶解备用，可分装冻存，防止反复冻融； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂五	液体 1 支	-20℃保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使微量液体落入管底（可手动甩一甩）； 2. 加入 1.1mL 蒸馏水溶解备用，可分装冻存，防止反复冻融； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。

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）、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

四、蔗糖-葡萄糖-果糖含量测定：

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 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 **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、检测步骤：

- ① 酶标仪预热 30 min 以上，调节波长到 340nm。
- ② 用前使所有试剂解冻或 30°C水浴 15-30min。
- ③ 为了减少操作误差，建议使用排枪。
- ④ 依次在 96 孔板中加入：

试剂组分 (μL)	测定管M	对照管M (仅做一次)	测定管N	对照管N (仅做一次)
样本	10		10	
试剂一	10	10		
试剂二	10	10	10	10
试剂三	160	170	170	180
混匀，30°C孵育5min后于340nm处读取各管的A1值				
试剂四	10	10	10	10
混匀，30°C反应30min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）				
试剂五			10	10
混匀，30°C反应20min于340nm处读取各管的A3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）				

- 【注】 1.测定管M和对照管M的值可以在读取A3的时候再重读一次，依此也可判读测定管M在30分钟读取A2时是否反应完全。
- 2.检测是否反应完全，在每次要读值的时候，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。
- 3.若A3值超过1.5，可减少样本加样量V1：如由10μL减至5μL，则试剂三相应增加；或对样本进行稀释，则改变后的V1和稀释倍数D代入公式计算。
- 4.若ΔA的差值较小如小于0.01，可增加样本量：如由10μL增至30μL，则试剂三相应减少。

五、结果计算：

$\Delta A_{\text{蔗糖}} = [(A2-A1)_{\text{测定管M}} - (A2-A1)_{\text{对照管M}}] - \Delta A_{\text{葡萄糖}}$;

$\Delta A_{\text{葡萄糖}} = (A2-A1)_{\text{测定管N}} - (A2-A1)_{\text{对照管N}}$;

$\Delta A_{\text{果糖}} = (A3-A2)_{\text{测定管N}} - (A3-A2)_{\text{对照管N}}$;

1、按样本质量计算：

$$\begin{aligned} \text{蔗糖含量(mg/g鲜重)} &= [\Delta A_{\text{蔗糖}} \div (\epsilon \times d)] \times V2 \times 10^3 \times 342.3 \div (V1 \div V \times W) \\ &= 2.1733 \times \Delta A_{\text{蔗糖}} \div W \times D \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{葡萄糖含量(mg/g鲜重)} &= [\Delta A_{\text{葡萄糖}} \div (\epsilon \times d)] \times V2 \times 10^3 \times 180.16 \div (V1 \div V \times W) \\ &= 1.1439 \times \Delta A_{\text{葡萄糖}} \div W \times D \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{果糖含量(mg/g鲜重)} &= [\Delta A_{\text{果糖}} \div (\epsilon \times d \times (V3 \div V2))] \times V3 \times 10^3 \times 180.16 \div (V1 \div V \times W) \\ &= 1.1439 \times \Delta A_{\text{果糖}} \div W \times D \end{aligned}$$

2、按照体积计算：

$$\begin{aligned}\text{蔗糖含量(mg/mL)} &= [\Delta A_{\text{蔗糖}} \div (\epsilon \times d)] \times V_2 \times 10^3 \times 342.3 \div V_1 \\ &= 2.1733 \times \Delta A_{\text{蔗糖}} \times D\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{葡萄糖含量(mg/mL)} &= [\Delta A_{\text{葡萄糖}} \div (\epsilon \times d)] \times V_2 \times 10^3 \times 180.16 \div V_1 \\ &= 1.1439 \times \Delta A_{\text{葡萄糖}} \times D\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{果糖含量(mg/mL)} &= [\Delta A_{\text{果糖}} \div (\epsilon \times d \times (V_3 \div V_2))] \times V_3 \times 10^3 \times 180.16 \div V_1 \\ &= 1.1439 \times \Delta A_{\text{果糖}} \times D\end{aligned}$$

ϵ ---NADPH的摩尔吸光系数为 $6.3 \times 10^4 \text{L/mol/cm}$;

d ---光径距离, 0.5cm;

V ---提取液体积, 1mL;

V_1 ---样本体积, $10\mu\text{L}=0.01\text{mL}$;

V_2 ---反应总体积, $200\mu\text{L}=2 \times 10^{-4}\text{L}$;

V_3 ---反应总体积, $210\mu\text{L}=2.1 \times 10^{-4}\text{L}$;

葡萄糖分子量---180.16;

果糖分子量---180.16;

蔗糖分子量---342.3;

W ---样本质量, g;

D ---稀释倍数, 未稀释即为1。