

果糖 (Fructose) 含量检测试剂盒说明书

(货号: ADS-W-TDX042 微板法 96 样 有效期: 3 个月)

一、指标介绍:

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:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
试剂一	粉剂 1 支	-20℃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 1.1mL 蒸馏水备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂二	25mL 液体×1 瓶	4℃保存	
试剂三	粉剂 1 支	-20℃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. 使粉剂落入底部,加入 1.1mL 蒸馏水备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂四	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 蒸馏水备用; 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、果糖含量检测:

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:** 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、检测步骤:

- 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:

试剂组分 (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5μL, 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50μL, 则试剂二相应减少。

五、结果计算:

- 1、按照质量计算:

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

- 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:

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

ϵ ---NADPH 的摩尔消光系数, 6.3×10^3 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, 2×10^{-4} 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。