

葡萄糖和果糖含量检测试剂盒说明书

(货号: ADS-W-TDX043 微板法 96 样 有效期: 3 个月)

一、指标介绍:

本试剂盒提供一种定量、快速、灵敏的检测葡萄糖和果糖含量的方法, 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, 进而分别计算得到葡萄糖和果糖含量。

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 使粉剂落入管底(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 使粉剂落入管底(可手动甩一甩); 2. 再加 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、葡萄糖和果糖含量检测:

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 **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℃, 设定波长到 340nm。
- ② 所有试剂解冻至室温(25℃), 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
混匀, 5min后于340nm处读取各管的A1值		
试剂三	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)		
试剂四	10	10
混匀, 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), ΔA葡萄糖=(A2-A1)测定-(A2-A1)空白, ΔA果糖=(A3-A2)测定-(A3-A2)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A3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30μL, 则试剂二相应减少。

五、结果计算:

1、按照质量计算:

葡萄糖(mg/g 鲜重)=[ΔA 葡萄糖÷(ε×d)×V2×Mr×10³]÷(W×V1÷V)×D=1.1439×ΔA 葡萄糖÷W×D

果糖(mg/g 鲜重)=[ΔA 果糖÷(ε×d)×V2×Mr×10³]÷(W×V1÷V)×D=1.1439×ΔA 果糖÷W×D

2、按照体积计算:

葡萄糖(mg/mL)=[ΔA 葡萄糖÷(ε×d)×V2×Mr×10³]÷V1×D=1.1439×ΔA 葡萄糖×D

果糖(mg/mL)=[ΔA 果糖÷(ε×d)×V2×Mr×10³]÷V1×D=1.1439×ΔA 果糖×D

ε ---NADPH 的摩尔消光系数, 6.3×10^3 L/mol/cm;

d---光径, 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---葡萄糖、果糖分子量, 180.16;

W---样本鲜重, g;

D---稀释倍数, 未稀释即为 1。