果糖（Fructose）含量检测试剂盒说明书

（货号：G0530W 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℃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℃保存	
试剂三	粉剂×1 支	-20℃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μL×1 支	-20℃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、水浴锅、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】：A.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。

B.若离心后的上清液（高脂或高蛋白样本如动物组织等）比较浑浊，可取出上清液转移至新 EP 管中再次或多次离心后取上清液测定；也可取上清液于 95℃孵育 5-10min 后离心取上清液测定。

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℃，设定波长到 340nm。

② 试剂解冻至室温（25℃），或可放在 25℃条件下水浴 5-15min。

③ 试剂一和二和三可按照 10:160:10 比例配成混合液（一枪加 180μL 该混合液）（**该混合液用多少配多少，现配现用**）。

④ 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，室温（25℃）反应20min于340nm读取A1值（若A1值继续增加，需延长反应时间，直至2分钟内变化值在0.1内）		
试剂四	10	10
混匀，室温（25℃）反应20min于340nm读取A2值（若A2值继续增加，需延长反应时间，直至2分钟内变化值在0.1内），ΔA=(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小于0.01，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：

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

2、按照细胞数量计算：

果糖含量(μg/10^4 cell)=$[\Delta A\div(\varepsilon\times d)\times V2\times Mr\times 10^6]\div(500\times V1\div V)\times D=1143.9\times\Delta A\div 500\times D$

3、按照体积计算：

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

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。