蔗糖-葡萄糖-果糖含量（己糖激酶法）测定试剂盒说明书

（货号：G0545W 微板法 96 样）

一、产品简介：

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：

试剂名称	规格	保存要求	备注
试剂一	1mL×1 支	4℃保存	可分装冻存，防止反复冻融。
试剂二	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 2.1mL 蒸馏水溶解备用。
试剂三	35mL 液体×1 瓶	4℃保存	
试剂四	粉剂×2 支	-20℃保存	临用前甩几下或离心，使粉剂落入底部，每支再加 1.1mL 蒸馏水溶解备用，可分装冻存，防止反复冻融。
试剂五	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 蒸馏水溶解备用，可分装冻存，防止反复冻融。

三、所需的仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、离心机、可调式移液器、研钵、水浴锅、冰和蒸馏水。

四、蔗糖-葡萄糖-果糖含量测定：

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】：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 **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 30 min 以上，调节波长到 340nm。

② 用前使所有试剂解冻或 30℃水浴 15-30min。

③ 试剂二和三可按照 10:160 或 10:170 比例配成混合液（一枪加 170μL 或 180μL 该混合液）（**该混合液用多少配多少，现配现用**）。为了减少操作误差，建议使用排枪。

④ 依次在 96 孔板中加入：

试剂名称（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℃孵育5min后于340nm处读取各管的A1值				
试剂四	10	10	10	10
混匀，30℃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分钟内变化值在0.1内）				
试剂五			10	10
混匀，30℃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分钟内变化值在0.1内）				

【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：

ΔA蔗糖=[(A2-A1)测定管M-(A2-A1)对照管M]-ΔA葡萄糖；

ΔA葡萄糖=(A2-A1)测定管N-(A2-A1)对照管N；

ΔA果糖=(A3-A2)测定管N-(A3-A2)对照管N；

1、按样本质量计算：

蔗糖含量(mg/g鲜重)=[ΔA蔗糖÷(ε×d)]×V2×10^3×342.3÷(V1÷V×W)

=2.1733×ΔA蔗糖÷W×D

葡萄糖含量(mg/g鲜重)=[ΔA葡萄糖÷(ε×d)]×V2×10^3×180.16÷(V1÷V×W)

=1.1439×ΔA葡萄糖÷W×D

果糖含量(mg/g鲜重)=[ΔA果糖÷(ε×d×(V3÷V2)]×V3×10^3×180.16÷(V1÷V×W)

=1.1439×ΔA果糖÷W×D

2、按照体积计算：

蔗糖含量(mg/mL)=[ΔA蔗糖÷(ε×d)]×V2×10^3×342.3÷V1

=2.1733×ΔA蔗糖×D

葡萄糖含量(mg/mL)=[ΔA葡萄糖÷(ε×d)]×V2×10^3×180.16÷V1

=1.1439×ΔA葡萄糖×D

果糖含量(mg/mL)=[ΔA果糖÷(ε×d×(V3÷V2)]×V3×10^3×180.16÷V1

=1.1439×ΔA果糖×D

ε---NADPH的摩尔吸光系数为6.3×10^3L/mol/cm； d---光径距离，0.5cm；

V---提取液体积，1mL； V1---样本体积，10μL=0.01mL；

V2---反应总体积，200μL=2×10^{-4}L； V3---反应总体积，210μL=2.1×10^{-4}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。