

## 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<sup>+</sup> 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°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 分钟内变化值在 0.1 内)				
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 分钟内变化值在 0.1 内)				

## 五、结果计算:

$\Delta A$  蔗糖 = [(A2-A1)测定管M - (A2-A1)对照管M] -  $\Delta A$  葡萄糖;

$\Delta A$  葡萄糖 = (A2-A1)测定管N - (A2-A1)对照管N;

$\Delta A$  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) = [ $\Delta A$  蔗糖 ÷ ( $\epsilon \times d$ )] × V2 × 10<sup>3</sup> × 342.3 ÷ (V1 ÷ V × W)

$$= 2.1733 \times \Delta A \text{ 蔗糖} \div W \times D$$

葡萄糖含量(mg/g 鲜重) = [ $\Delta A$  葡萄糖 ÷ ( $\epsilon \times d$ )] × V2 × 10<sup>3</sup> × 180.16 ÷ (V1 ÷ V × W)

$$= 1.1439 \times \Delta A \text{ 葡萄糖} \div W \times D$$

果糖含量(mg/g 鲜重) = [ $\Delta A$  果糖 ÷ ( $\epsilon \times d \times (V3 \div V2)$ )] × V3 × 10<sup>3</sup> × 180.16 ÷ (V1 ÷ V × W)

$$= 1.1439 \times \Delta A \text{ 果糖} \div W \times D$$

### 2、按照体积计算:

蔗糖含量(mg/mL) = [ $\Delta A$  蔗糖 ÷ ( $\epsilon \times d$ )] × V2 × 10<sup>3</sup> × 342.3 ÷ V1

$$= 2.1733 \times \Delta A \text{ 蔗糖} \times D$$

葡萄糖含量(mg/mL) = [ $\Delta A$  葡萄糖 ÷ ( $\epsilon \times d$ )] × V2 × 10<sup>3</sup> × 180.16 ÷ V1

$$= 1.1439 \times \Delta A \text{ 葡萄糖} \times D$$

果糖含量(mg/mL) = [ $\Delta A$  果糖 ÷ ( $\epsilon \times d \times (V3 \div V2)$ )] × V3 × 10<sup>3</sup> × 180.16 ÷ V1

$$= 1.1439 \times \Delta A \text{ 果糖} \times D$$

$\epsilon$ ---NADPH 的摩尔吸光系数为 6.3 × 10<sup>3</sup> L/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<sup>-4</sup>L;

V3---反应总体积, 210μL=2.1×10<sup>-4</sup>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。