

蔗糖-葡萄糖-果糖含量（己糖激酶法）测定试剂盒说明书

（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、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 **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、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 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分钟内的吸光值保持不变）				
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分钟内的吸光值保持不变）				

- 【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：

$$\begin{aligned} \text{蔗糖含量(mg/g鲜重)} &= [\Delta A \text{蔗糖} \div (\epsilon \times d)] \times V2 \times 10^3 \times 342.3 \div (V1 \div V \times W) \\ &= 2.1733 \times \Delta A \text{蔗糖} \div W \times D \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{葡萄糖含量(mg/g鲜重)} &= [\Delta A \text{葡萄糖} \div (\epsilon \times d)] \times V2 \times 10^3 \times 180.16 \div (V1 \div V \times W) \\ &= 1.1439 \times \Delta A \text{葡萄糖} \div W \times D \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{果糖含量(mg/g鲜重)} &= [\Delta A \text{果糖} \div (\epsilon \times d \times (V3 \div V2))] \times V3 \times 10^3 \times 180.16 \div (V1 \div V \times W) \\ &= 1.1439 \times \Delta A \text{果糖} \div W \times D \end{aligned}$$

2、按照体积计算：

$$\begin{aligned} \text{蔗糖含量(mg/mL)} &= [\Delta A \text{蔗糖} \div (\epsilon \times d)] \times V2 \times 10^3 \times 342.3 \div V1 \\ &= 2.1733 \times \Delta A \text{蔗糖} \times D \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{葡萄糖含量(mg/mL)} &= [\Delta A \text{葡萄糖} \div (\epsilon \times d)] \times V2 \times 10^3 \times 180.16 \div V1 \\ &= 1.1439 \times \Delta A \text{葡萄糖} \times D \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{果糖含量(mg/mL)} &= [\Delta A \text{果糖} \div (\epsilon \times d \times (V3 \div V2))] \times V3 \times 10^3 \times 180.16 \div V1 \\ &= 1.1439 \times \Delta A \text{果糖} \times D \end{aligned}$$

ϵ ---NADPH的摩尔吸光系数为 $6.3 \times 10^4 \text{L/mol/cm}$ ； 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=2×10⁻⁴L；

V3---反应总体积，210μL=2.1×10⁻⁴L；

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。