

果糖（Fructose）含量检测试剂盒说明书

（紫外分光法 48 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 1.4mL 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 1.4mL 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 1.4mL 蒸馏水备用。

三、所需仪器和用品：

紫外分光光度计、1mL 石英比色皿（光径 1cm）、天平、移液器、研钵、离心机、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】：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 **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。

- 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 紫外分光光度计预热 30min，设置温度在 25℃，设定波长到 340nm。
② 在 1mL 石英比色皿（光径 1cm）中依次加入：

试剂名称(μL)	测定管	空白管 (仅做一次)
样本	25	
试剂一	25	25
试剂二	600	625
试剂三	25	25
混匀, 反应20min于340nm处读取各管的A1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	25	25
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) $\Delta A=(A2-A1)$ 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10μL, 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50μL, 则试剂二相应减少。

五、结果计算:

- 1、按照质量计算:

$$\text{果糖含量(mg/g 鲜重)}=[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times Mr \times 10^3] \div (W \times V1 \div V) \times D = 0.8 \times \Delta A \div W \times D$$

- 2、按照细胞数量计算:

$$\text{果糖含量}(\mu\text{g}/10^4 \text{ cell})=[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times Mr \times 10^6] \div (500 \times V1 \div V) \times D = 800.7 \times \Delta A \div 500 \times D$$

- 3、按照体积计算:

$$\text{果糖含量(mg/mL)}=[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times Mr \times 10^3] \div V \times D = 0.8 \times \Delta A \times D$$

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

d ---1cm;

V ---加入提取液体积, 1mL;

$V1$ ---加入样本体积,

0.025mL; $V2$ ---反应总体积, 7×10^{-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。