

## TEST PROSEDÜRÜ:

## A. MANUEL TEST PROSEDÜRÜ; D-FRÜKTOZ VE D-GLİKOZ:

Dalga boyu	: 340 nm
Küvet	: 1 cm ışık yolu (cam veya plastik)
Sıcaklık	: ~ 25°C
Nihai hacim	: 2,32 mL (D-glikoz) 2,34 mL (D-fruktoz)
Numune solüsyonu	: Küvet başına 4-80 µg D-glikoz artı D-fruktoz (0,10-2,00 mL numune hacminde)
Havaya karşı okuma	: (ışık yolunda küvet olmadan) veya suya karşı okuyun

Pipette into cuvettes	Blank	Sample
distilled water (at ~ 25°C)	2.10 mL	2.00 mL
sample	-	0.10 mL
solution 1 (buffer)	0.10 mL	0.10 mL
solution 2 (NADP <sup>+</sup> /ATP)	0.10 mL	0.10 mL
Mix*, read the absorbances of the solutions (A <sub>1</sub> ) after approx. 3 min and start the reactions by addition of:		
suspension 3 (HK/G6P-DH)	0.02 mL	0.02 mL
Mix* and read the absorbances of the solutions (A <sub>2</sub> ) at the end of the reaction (approx. 5 min). If the reaction has not stopped after 5 min, continue to read the absorbances at 2 min intervals until the absorbances remain the same over 2 min**.		
<b>Then add:</b>		
suspension 4 (PGI)	0.02 mL	0.02 mL
Mix* and read the absorbances of the solutions (A <sub>3</sub> ) at the end of the reaction (approx. 8-10 min).		

\* Örneğin plastik bir spatula ile veya küveti bir küvet kapağı veya Parafilm® ile kapattıktan sonra hafifçe ters çevirerek.

\*\* Absorbans artmaya devam ederse, bunun nedeni numunedeki renk bileşiklerinin veya enzimlerin etkisi olabilir. Bu karışan maddeler numune hazırlama sırasında giderilebilir.

**B. MANUEL TEST PROSEDÜRÜ; TOPLAM AZALTAN ŞEKERLER:**

Şarap endüstrisinde, D-glikoz artı D-fruktozun toplamı, mayanın etanole dönüştürmek için kullanabileceği şeker miktarını temsil ettiğinden, önemli bir kalite parametresidir. Vakaların büyük çoğunluğunda, bu monosakkaritler arasında ayırım yapmak gereksizdir, bu da bunların aşağıdaki gibi daha uygun ve hızlı bir tahlil formatı kullanılarak birlikte nicelleştirilmesine olanak tanır:

**Ek hazırlık adımı:**

Lastik tıpalara yerleşmiş olabilecek herhangi bir enzimi çıkarmak için şişe 3 ve 4'ü hafifçe sallayın. Bir pipet kullanarak 4. şişenin (PGI) tüm içeriğini 3. şişeye (HK/G6P-DH) aktarın. Kauçuk tıpayı değiştirdikten sonra enzimleri hafifçe döndürerek karıştırın. Bu HK/G6P-DH/PGI karışımı artık kullanıma hazırdır. Bu adımı gerçekleştirdikten sonra, D-glukoz ve D-fruktoz bu kit reaktif karışımı ile ayrı ayrı ölçülemez.

**PROSEDÜR:**

<b>Dalga boyu</b>	: 340 nm
<b>Küvet</b>	: 1 cm ışık yolu (cam veya plastik)
<b>Sıcaklık</b>	: ~ 25°C
<b>Nihai hacim</b>	: 2,34 mL (D-glikoz artı D-fruktoz)
<b>Numune solüsyonu</b>	: Küvet başına 4-80 µg D-glikoz artı D-fruktoz (0,10-2,00 mL numune hacminde)
<b>Havaya karşı okuma</b>	: (ışık yolunda küvet olmadan) veya suya karşı okuyun

Pipette into cuvettes	Blank	Sample
distilled water (at ~ 25°C)	2.10 mL	2.00 mL
sample solution	-	0.10 mL
solution 1 (buffer)	0.10 mL	0.10 mL
solution 2 (NADP <sup>+</sup> /ATP)	0.10 mL	0.10 mL
Mix*, read the absorbances of the solutions ( $A_1$ ) after approx. 3 min and start the reactions by addition of:		
suspension 3 (HK/G6P-DH/PGI)	0.04 mL	0.04 mL
Mix* and read the absorbances of the solutions ( $A_{total}$ ) at the end of the reaction (approx. 10 min). If the reaction has not stopped after 10 min, continue to read the absorbances at 2 min intervals until the absorbances remain the same over 2 min**.		

- \* Örneğin plastik bir spatula ile veya küveti bir küvet kapağı veya Parafilm® ile kapattıktan sonra hafifçe ters çevirerek.  
\*\* Absorbans artmaya devam ederse, bunun nedeni numunedeki renk bileşiklerinin veya enzimlerin etkisi olabilir.  
Bu karışan maddeler numune hazırlama sırasında giderilebilir.

**C. OTO ANALİZÖR TEST PROSEDÜRÜ; TOPLAM AZALTAN ŞEKERLER:**

Bu kit, 254,1 mL reaktifin hazırlanması için uygundur (0,222 mL'lik 1155 reaksiyona eşdeğer). Reaktif hazırlama şu şekilde yapılır:

**R1'in hazırlanması:**

Component	Volume
bottle 1 (buffer)	1.0 mL
bottle 2 (NADP <sup>+</sup> /ATP)	1.0 mL (after adding 12 mL of H <sub>2</sub> O to bottle 2)
bottle 4 (PGI)	0.2 mL (swirl to mix before use)
PVP (10 g/L)	1.0 mL (or replace with H <sub>2</sub> O)
H <sub>2</sub> O	18.0 mL
Total volume	21.2 mL

**R2'nin hazırlanması:**

Component	Volume
bottle 3 (HK/G6P-DH)	0.2 mL (swirl to mix before use)
H <sub>2</sub> O	1.9 mL
Total volume	2.1 mL

**D. MİKROPLAKA TEST PROSEDÜRÜ; ARTIK ŞEKERLER**

<b>Dalga boyu</b>	: 340 nm
<b>Mikroplaka</b>	: 96 oyuklu (örn. şeffaf düz tabanlı, cam veya plastik)
<b>Sıcaklık</b>	: ~ 25°C
<b>Nihai hacim</b>	: 0,234 mL
<b>Doğrusallık</b>	: Kuyu başına 0,1-8 µg D-glikoz/D-fruktoz (0,01-0,20 mL numune hacminde)

Pipette into wells	Blank	Sample	Standard
distilled water	0.210 mL	0.200 mL	0.200 mL
sample solution	-	0.010 mL	-
standard solution	-	-	0.010 mL
solution 1 (buffer)	0.010 mL	0.010 mL	0.010 mL
solution 2 (NADP <sup>+</sup> /ATP)	0.010 mL	0.010 mL	0.010 mL
Mix* and read the absorbances of the solutions (A <sub>1</sub> ) after approx. 3 min (at completion of the pre-reaction). Start the reactions by addition of:			
suspension 3+4 (HK/G6P-DH/PGI)	0.004 mL	0.004 mL	0.004 mL
Mix* and read the absorbances of the solutions (A <sub>2</sub> ) at the end of the reaction (approx. 10 min). If the reaction has not stopped after 10 min, continue to read the absorbances at 2 min intervals until the absorbances increase constantly over 2 min**.			

\* Örneğin mikroplaka çalkalayıcı, mikroplaka okuyucuda çalkalama işlevi veya tekrarlanan aspirasyon (örn. 50-100 µL hacme ayarlanmış bir pipetör kullanarak).

\*\* Bu "sürünme" oranı numune için kör numuneden daha yüksekse, numune absorbanlarını 3+4 süspansiyonunun eklendiği zamana kadar tahmin edin.

## E. MİKROPLAKA TEST PROSEDÜRÜ; D-GLİKOZ VE D-FRÜKTOZ (Sıralı)

<b>Dalga boyu</b>	: 340 nm
<b>Mikroplaka</b>	: 96 oyuklu (örn. şeffaf düz tabanlı, cam veya plastik)
<b>Sıcaklık</b>	: ~ 25°C
<b>Nihai hacim</b>	: 0,234 mL
<b>Doğrusallık</b>	: Kuyu başına 0,1-8 µg D-glikoz/D-fruktoz (0,01-0,20 mL numune hacminde)

Pipette into wells	Blank	Sample	Standard
distilled water	0.210 mL	0.200 mL	0.200 mL
sample solution	-	0.010 mL	-
standard solution	-	-	0.010 mL
solution 1 (buffer)	0.010 mL	0.010 mL	0.010 mL
solution 2 (NADP <sup>+</sup> /ATP)	0.010 mL	0.010 mL	0.010 mL
Mix* and read the absorbances of the solutions (A <sub>1</sub> ) after approx. 3 min (at completion of the pre-reaction). Start the reactions by addition of:			
suspension 3 (HK/G6P-DH)	0.002 mL	0.002 mL	0.002 mL
Mix* and read the absorbances of the solutions (A <sub>2</sub> ) at the end of the reaction (approx. 5 min). If the reaction has not stopped after 5 min, continue to read the absorbances at 2 min intervals until the absorbances increase constantly over 2 min**.			
suspension 4 (PGI)	0.002 mL	0.002 mL	0.002 mL
Mix* and read the absorbances of the solutions (A <sub>3</sub> ) at the end of the reaction (approx. 8-10 min).			

\* Örneğin mikroplaka çalkalayıcı, mikroplaka okuyucuda çalkalama işlevi veya tekrarlanan aspirasyon (örn. 50-100 µL hacme ayarlanmış bir pipetör kullanarak) kullanarak.

\*\* Bu "sürünme" oranı numune için kör numuneden daha yüksekse, numune absorbanlarını süspansiyon 3'ün eklendiği zamana kadar tahmin edin.