

蔗糖 (sucrose) 含量检测试剂盒说明书

(货号:ADS-W-DF017 微板法 96 样)

一、产品简介:

蔗糖 (C₁₂H₂₂O₁₁; FW: 342.3), 是产生通用能量分子 ATP 的最重要的来源之一。蔗糖是一种二糖, 可分解为葡萄糖和果糖。

本试剂盒提供一种特异的蔗糖检测方法, 蔗糖酶转化蔗糖成葡萄糖和果糖, 葡萄糖被特异性氧化以产生与显色剂反应的 (粉) 红色产物, 该产物在 520nm 处有最大吸收峰, 通过校正游离的葡萄糖背景值进而得到蔗糖含量, 且其他二糖如麦芽糖和乳糖不会干扰本测定。

二、试剂盒组分与配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
试剂一	液体 6mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	液体 25mL×1 瓶	4°C保存	
试剂三	粉剂 1 支	-20°C保存	临用前甩几下使液体落入底部, 再加 3mL 的试剂一混匀备用。
试剂四	液体 11mL×1 瓶	4°C保存	临用前加 22mL 试剂二混匀备用。
试剂五	粉体 1 支	-20°C保存	临用前甩几下使粉体落入底部, 再加 2.1mL 的试剂二溶解。
标准管	粉体 1 支	室温干燥保存	用前准确称取 2mg 粉体即葡萄糖至一新 EP 管中, 再加 2mL 蒸馏水充分溶解即得 1mg/mL 标准品, 再用蒸馏水稀释成 0.5mg/mL, 待用。(该标准品粉体开封后也需干燥保存和使用)

三、所需仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、天平、移液器、研钵、离心机、蒸馏水。

四、蔗糖含量检测:

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:

取 0.1g 组织样本 (水分充足的果实样本建议取 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较高, 可先进行脱蛋白处理:取 0.1g 组织样本 (水分充足的果实样本建议取 0.2g 左右), 加 1mL 的蒸馏水研磨, 粗提液全部转移到 EP 管中, 再于 95°C 水浴 5min 后冷却至室温, 若水分蒸发可用蒸馏水补齐至 1mL, 最后于 12000rpm, 常温离心 10min, 上清液待测。

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。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 30min, 设置温度在 25°C, 设定波长到 520nm。

② 一般组织样本 (如叶片等) 检测前需稀释 5 倍, 果实类样本, 需稀释 10-20 倍。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。

③ 所有试剂解冻至室温 (25°C), 在 96 孔板中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管	对照管	标准管 (仅做一次)	空白管 (仅做一次)
样本	10	10		
标准品			10	
蒸馏水				10
试剂一		30		
试剂三	30		30	30
务必混匀 (可用枪吹打混匀), 37°C条件下孵育 20min				
试剂四	150	150	150	150
试剂五	10	10	10	10
混匀, 37°C条件下避光孵育 30min, 520nm 下读取吸光值 A, ΔA 蔗糖=A 测定-A 对照-A 空白 (每个样本做一个自身对照)。				

【注】1.测定管和对照管的 A 值若超过 1, 样本用蒸馏水进行稀释, 稀释倍数 D 代入计算公式。

2.若ΔA 蔗糖的值低于 0.005, 则可减少样本稀释倍数或不稀释, 或者增加样本加样体积 V1 (由 10μL 增至 50μL, 则试剂四相应减少), 或者增加取样质量 W (如由 0.1g 增至 0.2g)。则改变后的稀释倍数 D 和 V1 和 W 需带入公式重新计算。

五、结果计算:

1、按照质量计算:

$$\begin{aligned} \text{蔗糖含量(mg/g 鲜重)} &= (C \text{ 标准} \times V1) \times \Delta A \text{ 蔗糖} \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \times 342.3 \div 180.16 \div (W \times V1 \div V) \times D \\ &= 0.95 \times \Delta A \text{ 蔗糖} \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \div W \times D \end{aligned}$$

2、按照体积计算:

$$\begin{aligned} \text{蔗糖含量(mg/mL)} &= (C \text{ 标准} \times V1) \times \Delta A \text{ 蔗糖} \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \times 342.3 \div 180.16 \div V1 \times D \\ &= 0.95 \times \Delta A \text{ 蔗糖} \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \times D \end{aligned}$$

蔗糖分子量---342.3;

葡萄糖分子量---180.16;

C 标准---葡萄糖标准品的浓度, 0.5mg/mL; V---加入提取液体积, 1mL;

V1---加入样本体积, 0.01mL;

W---样本鲜重, g;

D---稀释倍数, 未稀释即为 1。