

蔗糖 (sucrose) 含量检测试剂盒说明书

(货号:ADS-W-DF017 微板法 96 样 有效期: 6 个月)

一、指标介绍:

蔗糖 ($C_{12}H_{22}O_{11}$; 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:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
试剂一	液体 6mL×1 瓶	4℃避光保存	
试剂二	液体 25mL×1 瓶	4℃保存	
试剂三	粉剂 1 瓶	-20℃保存	1. 开盖前注意使粉剂落入底部 (可手动甩一甩); 2. 加入 3mL 的试剂一混匀备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂四	液体 11mL×1 瓶	4℃避光保存	1. 临用前加 22mL 试剂二混匀备用; 2. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂五	粉体 1 瓶	-20℃避光保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部 (可手动甩一甩); 2. 加入 2.1mL 的试剂二溶解; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
标准管	粉体 1 支	室温干燥保存	1. 用前准确称取 2mg 粉体即葡萄糖至一新 EP 管中; 2. 加入 2mL 蒸馏水充分溶解即得 1mg/mL 标准品; 3. 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); 4. 保存周期与试剂盒有效期相同。

三、实验器材:

研钵 (匀浆机)、冰盒 (制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅 (烘箱、培养箱、金属浴)、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

四、蔗糖含量检测:

建议先选取 1-3 个差异大的样本 (例如不同类型或分组) 进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

1、样本提取:

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℃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、检测步骤：

- ① 酶标仪预热 30min，设置温度在 25℃，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℃），在 96 孔板中依次加入：

试剂组分 (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℃条件下孵育 20min				
试剂四	150	150	150	150
试剂五	10	10	10	10
混匀，37℃条件下避光孵育 30min，520nm 下读取吸光值 A， $\Delta A \text{ 蔗糖} = A \text{ 测定} - A \text{ 对照} - A \text{ 空白}$ （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 $\Delta A \text{ 蔗糖}$ 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：

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

2、按照体积计算：

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

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。