

## 蔗糖 (sucrose) 含量检测试剂盒说明书

(分光法 48 样)

## 一、产品简介:

蔗糖 (C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub>; 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 8mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂二	液体 45mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂三	液体 mL×1 支	-20°C 保存	临用前甩几下, 使液体落入底部, 再加 4mL 的试剂一混匀备用。
试剂四	液体 22mL×1 瓶	4°C 保存	临用前加 44mL 的试剂二混匀。
试剂五	粉体 mg×1 瓶	-20°C 保存	临用前甩几下, 使液体落入底部, 再加 8.4mL 的试剂二溶解。
标准管	粉体 mg×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 4 倍成 0.25mg/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:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿(光径 1cm)、移液器、研钵、常温离心机、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 室温离心 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】:** 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 可见分光光度计预热 30min, 设置温度在 25°C, 设定波长到 520nm, 蒸馏水调零。

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 EP 管中依次加入：

试剂名称（ $\mu\text{L}$ ）	测定管	对照管	标准管 （仅做一次）	空白管 （仅做一次）
样本	40	40		
标准品			40	
蒸馏水				40
试剂一		80		
试剂三	80		80	80
务必混匀（可用枪吹打混匀），37℃条件下孵育 20min				
试剂四	600	600	600	600
试剂五	80	80	80	80
混匀，37℃条件下避光孵育 30min，转移全部澄清液体至 1mL 玻璃比色皿(光径 1cm)中，于 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 40 $\mu\text{L}$  增至 80 $\mu\text{L}$ ，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：

$$\begin{aligned} \text{蔗糖含量}(\text{mg/g 鲜重}) &= (\text{C 标准} \times \text{V1}) \times \Delta A \text{ 蔗糖} \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \times 342.3 \div 180.16 \div (\text{W} \times \text{V1} \div \text{V}) \times \text{D} \\ &= 0.475 \times \Delta A \text{ 蔗糖} \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \div \text{W} \times \text{D} \end{aligned}$$

2、按照体积计算：

$$\begin{aligned} \text{蔗糖含量}(\text{mg/mL}) &= (\text{C 标准} \times \text{V1}) \times \Delta A \text{ 蔗糖} \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \times 342.3 \div 180.16 \div \text{V1} \times \text{D} \\ &= 0.475 \times \Delta A \text{ 蔗糖} \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \times \text{D} \end{aligned}$$

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，0.25mg/mL；

V---加入提取液体积，1mL；

V1---加入样本体积，0.04mL；

W---样本鲜重，g；

D---稀释倍数，未稀释即为 1。