

蔗糖（sucrose）含量（蒽酮比色法）试剂盒说明书

（货号：BP10266W 微板法 96 样 有效期：9 个月）

一、指标介绍：

蔗糖是光合作用的主要产物，广泛分布于植物体内，特别是甜菜、甘蔗和水果中含量极高。蔗糖由葡萄糖和糖脱水缩合形成，易溶于水较难溶于乙醇。

在酸性条件下，将蔗糖水解生成果糖和葡萄糖，采用蒽酮比色法，生成的产物在 620nm 下有特征吸收峰，进而计算出蔗糖的含量。

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 2mL×1 支	4℃保存	
试剂二	粉剂 4 瓶	4℃避光保存	
标准品	粉剂 1 支	4℃保存	1. 临用前称量取出 2mg 标准品至一新 EP 管中； 2. 再加 2mL 蒸馏水溶解即 1mg/mL 标准品； 3. 再用蒸馏水稀释成 0.3mg/mL 蔗糖标准品溶液，备用（现配现用，三天内用完）； 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、乙醇、浓硫酸、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

四、指标测定：

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，以免造成样本或试剂不必要的浪费！

建议：选取样本做几个梯度的稀释，选取适合本次实验的稀释倍数 D。

1、样本提取

① 组织样本：

称取 0.1g 样本（若是干样，如烘干烟叶等可取 0.05g；若是水分充足的样本可取 0.2g），先加入 0.8mL 的 80%乙醇（自备：取 80mL 乙醇溶于 20mL 蒸馏水中），冰浴匀浆，倒入有盖离心管中，再用 80%乙醇冲洗研钵并转移至同一 EP 管中，使 EP 管中粗提液终体积定容为 1.5mL（若用自动研磨机可直接加入 1.5mL 的 80%乙醇研磨）；置 50℃水浴 20min（封口膜缠紧，防止液体散失，且间隔 2min 振荡混匀一次），冷却后（若有损失，可加 80%乙醇补齐至 1.5mL），12000rpm，室温离心 10min，取上清液备用。

② 液体样本：

澄清的液体样本直接检测，若浑浊则需 12000rpm，室温离心 10min，取上清液备用。

2、检测步骤：

① 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 620nm。

② 调节水浴锅至 95℃，工作液的配制：临用前在一瓶试剂二中加入 1.5mL 蒸馏水后，缓慢加入 8.5mL 浓硫酸，充分溶解（若难溶解，70℃加热溶解；剩余试剂 4℃保存一周）。

③ 上清液稀释：可先取 2 个样本预测，确定适合本批样本的稀释浓度 D：叶片类样本可稀释 10 倍，含糖量高的果肉类样本可稀释 20 倍左右。

④ 在 EP 管中依次加入：

试剂 (μL)	测定管	标准管 (仅做一次)	空白管 (仅做一次)
样本	40		
标准品		40	
蒸馏水			40
试剂一	20	20	20
务必混匀 (可用枪吸打混匀), 95°C煮沸 10min (盖紧, 防止水分散失)			
工作液	360	360	360
混匀, 95°C水浴 10min (封口膜缠紧, 防止水分散失), 冷却至室温后, 取 200μL 转移至 96 孔板中, 于 620nm 读取吸光值 A, $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{空白管}}$ 。			

【注】：如果 ΔA 大于 1，需要将样本用蒸馏水稀释（严禁稀释加热反应后的混合液，否则会出现浑浊现象），计算公式中乘以相应稀释倍数 D。

五、结果计算：

1、按照重量计算：

$$\begin{aligned} \text{蔗糖含量}(\text{mg/g 重量}) &= (C_{\text{标准}} \times V_1) \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div (W \times V_1 \div V) \times D \\ &= 0.45 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div W \times D \end{aligned}$$

2、按照体积计算：

$$\begin{aligned} \text{蔗糖含量}(\text{mg/mL 液体}) &= (C_{\text{标准}} \times V_1) \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div V_1 \times D \\ &= 0.3 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times D \end{aligned}$$

3、按照蛋白浓度计算：

$$\begin{aligned} \text{蔗糖含量}(\text{mg/mg prot}) &= (C_{\text{标准}} \times V_1) \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div (C_{\text{pr}} \times V_1 \div V) \times D \\ &= 0.45 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div C_{\text{pr}} \times D \end{aligned}$$

C 标准---蔗糖标准品浓度, 0.3mg/mL;

D---稀释倍数, 未稀释即为 1;

V---加入提取液体积, 1.5mL;

V1---加入样本体积, 0.02mL;

W---样本鲜重, g;

Cpr---蛋白浓度 (mg/mL) ; 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。