

山梨醇含量测定说明书

(货号: BP10313W 微板法 96 样 有效期: 6 个月)

一、指标介绍:

山梨醇广泛存在于动物、植物、微生物细胞中, 作为一种糖的运输形式, 与生物抗逆性有关, 可作为食品添加剂, 增加食物风味。在糖代谢、抗逆性和食品研究中经常需要检测山梨醇含量。

山梨醇在碱性溶液中与铜离子形成蓝色络合物, 在 655nm 波长有特征吸收峰, 进而得出样本中山梨醇含量。

二、试剂盒的组成和配制:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
试剂一	粉体 2 支	4℃避光保存	每支: 1. 开盖前注意使粉体落入底部(可手动甩一甩); 2. 分别加 2mL 蒸馏水充分溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂二	液体 3.5mL×1 瓶	4℃保存	
标准品	粉体 1 支	4℃保存	1. 若重新做标曲, 则用到该试剂; 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制; 3. 溶解后的标品一周内用完。

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、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, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

1、样本提取:

① 组织样本:

称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 蒸馏水, 研磨匀浆后, 95℃水浴浸提 10 分钟(盖紧用封口膜封口, 以防止水分散失), 冷却后, 4℃×12000rpm 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照组织质量(g): 提取液体积(mL)为 1: 5~10 的比例进行提取。

② 细菌/细胞样本:

先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 取约 500 万细菌或细胞加入 1mL 蒸馏水, 超声波破碎细菌或细胞(冰浴, 功率 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次); 95℃水浴浸提 10 分钟(盖紧用封口膜封口, 以防止水分散失), 冷却后, 4℃×12000rpm 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照细菌/细胞数量(10^4): 提取液(mL)为 500~1000: 1 的比例进行提取。

③ 液体样本: 直接检测; 若浑浊, 离心后取上清检测。

2、检测步骤:

① 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 655nm, 所有试剂解冻至室温(25℃)。

② 在 EP 管中依次加入:

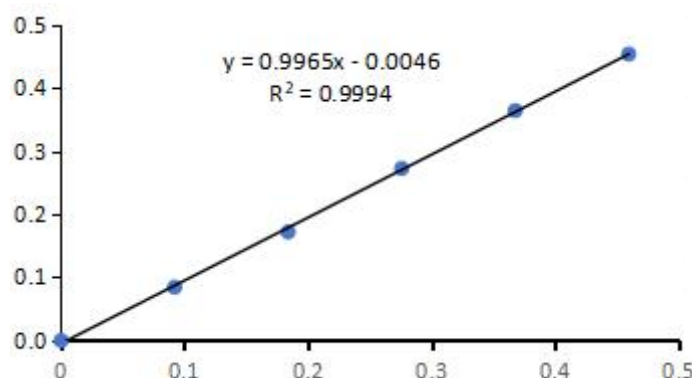
试剂组分(μL)	测定管	空白管(只做一次)
----------	-----	-----------

试剂一	35	35
试剂二	35	35
样本	230	
蒸馏水		230
震荡显色 15min, 12000rpm、室温 (25℃) 离心 5min, 取 200μL 上清液至 96 孔板中, 于 655nm 处读取吸光值 A, ΔA=A 测定管-A 空白管。		

【注】若 A 测定大于 1, 可对样本用蒸馏水进行稀释后测定, 或减少样本量 V1 (如减至 100μL, 则补加 130μL 的蒸馏水), 则稀释倍数 D 或改变后的加样量 V1 重新代入公式计算。

五、结果计算:

1、标准曲线方程: $y = 0.9965x - 0.0046$, x 是标准品质量 (mg), y 是 ΔA。



2、按样本鲜重计算:

$$\text{山梨醇含量(mg/g)} = [(\Delta A + 0.0046) \div 0.9965] \div (W \times V1 \div V) \times D = 4.36 \times (\Delta A + 0.0046) \div W \times D$$

3、按照蛋白浓度计算:

$$\text{山梨醇含量(mg/mg prot)} = [(\Delta A + 0.0046) \div 0.9965] \div (Cpr \times V1 \div V) \times D = 4.36 \times (\Delta A + 0.0046) \div Cpr \times D$$

4、按细菌或细胞密度计算:

$$\begin{aligned} \text{山梨醇含量(mg / } 10^4 \text{ cell)} &= [(\Delta A + 0.0046) \div 0.9965] \div (500 \times V1 \div V) \times D \\ &= 0.009 \times (\Delta A + 0.0046) \times D \end{aligned}$$

5、按液体体积计算:

$$\text{山梨醇含量(mg/mL)} = [(\Delta A + 0.0046) \div 0.9965] \div V1 \times D = 4.36 \times (\Delta A + 0.0046) \times D$$

V---加入提取液体积, 1mL;

V1---加入样本体积, 0.23mL ;

W---样本鲜重, g;

500---细菌或细胞总数, 500 万;

D---稀释倍数, 若未稀释则值为 1。

附: 标准曲线制作过程:

1 标准品用 1mL 蒸馏水溶解 (母液需在两天内用), 标准品母液浓度为 10mg/mL。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品, 例如: 0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2 mg/mL。也可根据实际样本调整标准品浓度。

2 标品稀释参照表如下:

吸取标准品母液 400uL, 加入 1600uL 蒸馏水, 混匀得到 2mg/mL 的标品稀释液待用。						
标品浓度	0	0.4	0.8	1.2	1.6	2

mg/mL						
标品稀释液 uL	0	80	160	240	320	400
水 uL	400	320	240	160	80	0
各标准管混匀待用。						

- 3 依据测定管加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。

试剂名称 (μL)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
试剂一	35	35
试剂二	35	35
标品	230	
蒸馏水		230
震荡显色 15min, 12000rpm、室温 (25°C) 离心 5min, 取 200μL 上清液至 96 孔板中, 于 655nm 处读取吸光值 A, $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{0 浓度管}}$		