

山梨醇含量试剂盒说明书

微量法 100 管/96 样

注 意：正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义：

山梨醇广泛存在于动物、植物、微生物和培养细胞中，不仅是糖运输形式之一，而且与生物抗逆性和食物风味密切相关。因此，在糖代谢、抗逆性和食品研究中经常需要检测山梨醇含量变化。

测定原理：

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。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计/酶标仪、水浴锅、移液器、微量石英比色皿/96 孔板、研钵、冰和蒸馏水。

试剂的组成和配制：

试剂一：液体 3.5mL×1 瓶，4℃保存；

试剂二：液体 3.5mL×1 瓶，4℃保存。

山梨醇的提取：

按照组织质量（g）：蒸馏水体积（mL）为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 蒸馏水），研磨成匀浆，95℃水浴 10 分钟（盖紧，以防止水分散失），冷却后，8000g，25℃离心 10min，取上清液待测。

测定步骤：

1、分光光度计或酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 655nm，蒸馏水调零。

2、加样表（在 EP 管中依次加入下列试剂）：

试剂（ μL ）	空白管	测定管
试剂一	35	35
试剂二	35	35
样本		230
蒸馏水	230	

混匀后室温静置 15min，8000g，25℃离心 10min，取 200 μL 上清液至微量石英比色皿或 96 孔板中，测 655nm 下吸光值 A，计算 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{空白管}}$ 。空白管只要做一管。

山梨醇含量计算：

a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

1、标准条件下测定回归方程为 $y = 0.352x - 0.002$ ；x 为标准品浓度（mg/mL），y 为吸光值。

2、按照样品质量计算

山梨醇含量（mg/g 鲜重）= $[(\Delta A + 0.002) \div 0.352 \times V1] \div (W \times V1 \div V2) = 2.84 \times (\Delta A + 0.002) \div W$

3、按照样本蛋白浓度计算

山梨醇含量（mg/mg prot）= $[(\Delta A + 0.002) \div 0.352 \times V1] \div (V1 \times Cpr) = 2.84 \times (\Delta A + 0.002) \div Cpr$

V1: 加入样本体积, 0.23mL; V2: 加入提取液体积, 1 mL; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量, g

b.用 96 孔板测定的计算公式如下

1、标准条件下测定回归方程为 $y = 0.176x - 0.002$; x 为标准品浓度 (mg/mL), y 为吸光值。

2、按照样品质量计算

$$\text{山梨醇含量 (mg /g 鲜重)} = [(\Delta A + 0.002) \div 0.176 \times V1] \div (W \times V1 \div V2) = 5.68 \times (\Delta A + 0.002) \div W$$

3、按照样本蛋白浓度计算

$$\text{山梨醇含量 (mg /mg prot)} = [(\Delta A + 0.002) \div 0.176 \times V1] \div (V1 \times Cpr) = 5.68 \times (\Delta A + 0.002) \div Cpr$$

V1: 加入样本体积, 0.23mL; V2: 加入提取液体积, 1 mL; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量, g

注意: 最低检测限为 1 μ g/g 鲜重或 0.01 μ g /mg prot