山梨醇含量测定说明书

（货号：G0560W 微板法 96 样）

一、产品简介：

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：

试剂名称	规格	保存要求	备注
试剂一	粉体 mg×2 瓶	4℃保存	每瓶临用前甩几下使粉体落入底部，再分别加 2mL 蒸馏水充分溶解备用。
试剂二	液体 7mL×1 瓶	4℃保存	
标准品	粉体 mg×1 支	4℃保存	若重新做标曲，则用到该试剂

三、所需的仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

四、山梨醇含量检测：

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：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 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、上机检测：

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℃）。

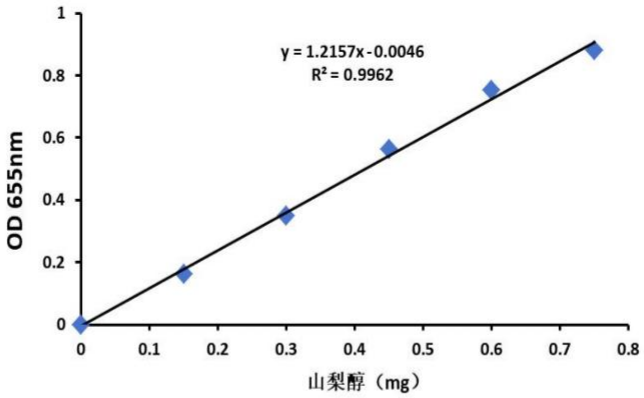
② 在 EP 管中依次加入：

试剂名称（μL）	测定管	对照管
试剂一	35	
试剂二	35	35
样本	150	150
蒸馏水	80	115
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 对照管（每个测定管需设一个对照管）。		

【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 = 1.2157x - 0.0046，x 是标准品（山梨醇）质量（mg），y 是△A。



2、按样本鲜重计算：

山梨醇含量(mg/g)= [(△A+0.0046)÷1.2157]÷(W×V1÷V)×D=5.48×(△A+0.0046)÷W×D

3、按细菌或细胞密度计算：

山梨醇含量(mg/10^4 cell)=[(△A+0.0046)÷1.2157]÷(500×V1÷V)×D

=5.48×(△A+0.0046)÷500×D

4、按液体体积计算：

山梨醇含量(mg/mL)=[(△A+0.0046)÷1.2157]÷V1×D=5.48×(△A+0.0046)×D

V---加入提取液体积，1mL；　　V1---加入样本体积，0.15mL ；

W---样本鲜重，g；　　500---细菌或细胞总数，万；

D---稀释倍数，若未稀释则值为 1。

附：标准曲线制作过程：

1　制备标准品母液（10mg/mL）：标准品用 1mL 蒸馏水溶解（母液需在两天内用）。

2　把母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品：0, 1, 2, 3, 4, 5mg/mL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。

3　依据测定管的加样体系操作，根据结果即可制作标准曲线。