（本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断！）

产品货号：E-BC-F042

产品规格：96T(39 samples)

检测仪器：酶标仪(激发波长为 535 nm，发射波长为 590 nm)

Elabscience®蔗糖荧光法测试盒

Sucrose Fluorometric Assay Kit

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话：400-999-2100

邮箱：biochemical@elabscience.cn

网址：www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。

联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

用途

本试剂盒适用于检测各种植物组织中蔗糖的含量。

检测原理

蔗糖能在偏酸性条件下被蔗糖酶水解成葡萄糖，葡萄糖被葡萄糖氧化酶催化生成过氧化氢，在辣根过氧化物酶的作用下，过氧化氢能与荧光探针反应，生成强红色荧光物质，荧光强度在一定范围内与蔗糖含量呈线性关系。

提供试剂和物品

编号	名称	规格 (Size)(96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	提取液 (Extraction Solution)	45 mL×1 瓶	-20°C 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	酶试剂 1 (Enzyme Reagent 1)	粉剂×1 支	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	缓冲液 (Buffer Solution)	10 mL×1 瓶	-20°C 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	酶试剂 2 (Enzyme Reagent 2)	粉剂×1 支	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂五 (Reagent 5)	探针 (Probe)	0.25mL×1 支	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂六 (Reagent 6)	标准品 (Standard)	粉剂×1 瓶	-20°C 保存 6 个月
	96 孔黑色酶标板	96 孔×1 块	无要求
	96 孔覆膜	2 张	
	样本位置标记表	1 张	

说明：试剂严格按上表中的保存条件保存，不同测试盒中的试剂不能混用。

对于体积较少的试剂，使用前请先离心，以免量取不到足够量的试剂。

所需自备物品

仪器：酶标仪(激发波长为 535 nm，发射波长为 590 nm)

试剂准备

① 检测前，将试剂平衡至室温。

② 试剂一工作液配制：

将试剂一与双蒸水按照体积比1: 9混合均匀，配制成试剂一工作液，未使用完的试剂可在2-8°C保存7天。

③ 试剂二工作液配制：

将0.3 mL双蒸水加入一整支试剂二中，混匀溶解；未使用完的试剂可在-20°C避光保存7天。

④ 试剂四工作液配制：

将0.25 mL双蒸水加入一支试剂四中，震荡至溶解均匀；未用完部分可在-20°C避光保存7天。

⑤ 10 mmol/L标准品溶液配制：

将10 mL双蒸水加入试剂六中，震荡至溶解均匀。标准品储备溶液可在2-8°C条件下保存7天。

⑥ 100 μmol/L标准品溶液配制：

取10 μL 10 mmol/L标准品加入990 μL试剂一工作液中，混匀，现配现用。

⑦ 反应工作液配制：

按照试剂三：试剂四工作液：试剂五体积比= 46 : 2 : 2配制反应工作液，按需配制，现配现用。

⑧ 不同浓度标准品的稀释：

编号	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
标准品浓度(μmol/L)	**0**	**1**	**2**	**5**	**8**	**10**	**12**	**15**
100 μmol/L 标准品(μL)	0	5	10	25	40	50	60	75
试剂一工作液(μL)	500	495	490	475	460	450	440	425

样本准备

① 样本处理

植物组织样本：取 0.1 g 新鲜植物组织放入匀浆容器中，加入 0.9 mL 试剂一工作液匀浆。12000 × g 4°C 离心 10 min，取上清液待测。若不能当天检测，上清液样本置于-20°C 环境下可保存 5 天。

② 样本的稀释

在正式检测前，需选择2-3个预期差异大的样本稀释成不同浓度进行预实验，根据预实验的结果，结合本试剂盒的线性范围：0.15-15 μmol/L，请参考下表稀释(仅供参考)：

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
10%玉米粒组织	1500	10%胡萝卜组织	1500
10%土豆组织	300-500	10%洋葱组织	500-1000
10%西红柿组织	200-300	10%青椒组织	500-1000
10%乔木叶片组织	200-400	10%灌木叶片组织	20-50

注：稀释液为试剂一工作液。

实验关键点

① 试剂二加入量须严格控制，否则会产生较大误差。

② 荧光探针反应时须避光进行。

操作步骤

① 标准孔：取 2.5 μL 试剂二工作液，分别加入到各标准孔中；

测定孔：取 2.5 μL 试剂二工作液，加入到各测定孔中；

对照孔：取 2.5 μL 试剂一工作液，加入各对照孔中。

对照空白孔：取 2.5 μL 试剂一工作液，加入对照空白孔中；

② 向步骤①的标准孔中加入 50 μL 不同浓度标准品；

向步骤①的测定孔和对照孔中分别加入 50 μL 待测样品；

向步骤①的对照空白孔中加入 50 μL 试剂一工作液。

③ 振板 10 s，37°C 孵育 15 min。

④ 向步骤③的各孔中加入 50 μL 反应工作液。

⑤ 振板 10 s，37°C 避光孵育 30 min，酶标仪激发波长为 535 nm，发射波长为 590 nm，测定各孔荧光强度。

操作表

	标准孔	**测定孔**	**对照孔**	**对照空白孔**
试剂二工作液(μL)	2.5	2.5	--	--
试剂一工作液(μL)	--	--	2.5	2.5
不同浓度标准溶液(μL)	50	--	--	--
待测样本(μL)	--	50	50	--
试剂一工作液(μL)	--	--	--	50
振板 10 s，37°C 孵育 15 min				
反应工作液(μL)	50	50	50	50
振板 10 s，37°C 避光孵育 30 min，酶标仪激发波长为 535 nm，发射波长为 590 nm，测定各孔荧光强度。				

结果计算

标准品拟合曲线： $y = ax + b$

$$\text{蔗糖含量 (μmol/g wet weight)} = \frac{\Delta F - b}{a} \times V \times f \div W \div 1000$$

注解:

y：标准品绝对荧光值：标准品荧光强度-空白孔荧光强度(标准品浓度为0时的荧光强度)

x：标准品的浓度

a：标准曲线斜率

b：标准曲线截距

ΔF：样本的绝对荧光值：$\Delta F = (F - F_0) - (F' - F_0')$

F：测定孔的荧光强度

F_0：空白孔荧光强度

F'：对照孔的荧光强度

F_0'：对照空白孔的荧光强度

V：组织提取液总体积(0.9 mL)

f：样本加入检测体系前的稀释倍数

W：称取的植物样本质量(0.1 g)

10^3：单位换算系数

附录1 关键数据

1. 技术参数

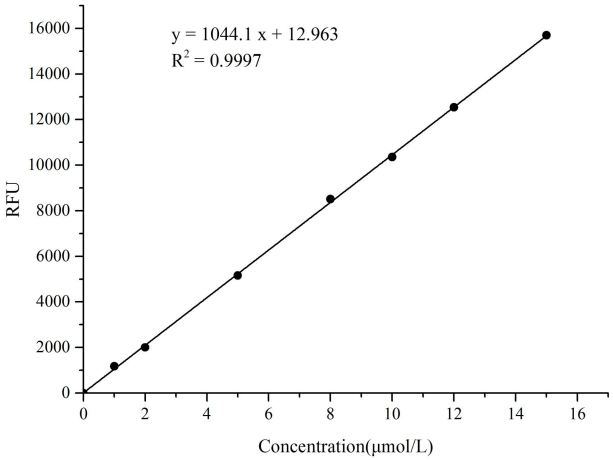
检测范围	0.15-15 μmol/L	**平均批间差**	6.5 %
灵敏度	0.15 μmol/L	**平均批内差**	2.3 %
平均回收率	96 %		

2. 标准曲线(数据仅供参考)

①不同浓度标准品加样量50 μL，按照操作步骤进行实验，荧光值如下表所示：

标准品浓度 (μmol/L)	**0**	**1**	**2**	**5**	**8**	**10**	**12**	**15**
荧光值	3020	4234	4953	8142	11568	13374	15512	18765
	3130	4268	5212	8319	11609	13484	15714	18776
平均荧光值	3075	4251	5083	8231	11589	13429	15613	18771
绝对荧光值	0	1176	2008	5156	8514	10354	12538	15696

②绘制标曲(如下图)：



附录2 实例分析

例如检测玉米组织(数据仅供参考)：

例如检测10%新鲜玉米组织匀浆，稀释1500倍，取稀释后的2.5 μL新鲜玉米粒样本匀浆上清，按说明书操作，其结果如下：标准曲线： $y = 1044.1x + 12.953$，测定孔平均荧光强度值为10950，对照孔平均荧光强度值为1215，空白孔平均荧光强度值为3075，对照空白孔平均荧光强度值为957，计算结果为：

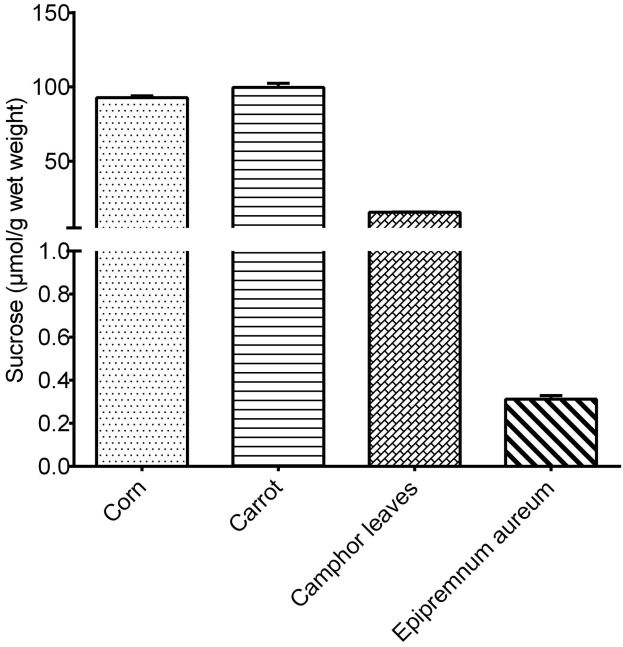
样本的绝对荧光值计算结果为：

$$\Delta F = (10950 - 3075) - (1215 - 957) = 7617$$

样本的蔗糖含量计算结果为：

$$\text{蔗糖含量 (μmol/g wet weight)} = \frac{7617 - 12.953}{1044.1} \times 0.9 \times 1500 \div 0.1 \div 10^3 = 98.32\ \mu\text{mol/g wet weight}$$

按照说明书，测定玉米组织(10%组织匀浆稀释1500倍，加样量2.5 μL)、胡萝卜组织(10%组织匀浆稀释1500倍，加样量2.5 μL)、樟树叶组织(10%组织匀浆稀释150倍，加样量2.5 μL)和绿萝叶组织(10%组织匀浆稀释25倍，加样量2.5 μL)蔗糖含量(如下图)：



附录3 问题答疑

问题	可能原因	建议解决方案
荧光值很低	荧光探针保存不当失效	更换新的探针试剂
	显色时未保持避光环境，荧光探针失效	重新实验，在显色时保证酶标板避光环境
	蔗糖浓度过高使荧光探针猝灭	对样本进行适当稀释后重新实验
ΔF 值很低或小于 0	样本蔗糖含量很低	减小样本稀释倍数重新实验
	试剂二保存不当失活	更换新的在有效期内的试剂重新实验

声明

1. 试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，我公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器，严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责，使用前请充分考虑样本可能的使用量，预留充足的样本。

附录4 客户发表文献

1. Tseng S.Ja. An acid degradable, lactate oxidizing nanoparticle formulation for non-small cell lung cancer virotherapy[J]. Nano Today. IF:18.962
2. Salman T M, Iyanda M A, Alli-Oluwafuyi A M, et al. Telfairia occidentalis stimulates hepatic glycolysis and pyruvate production via insulin-dependent and insulin-independent mechanisms[J]. Metabolism Open, 2021, 10(1-10):100092. IF:8.694
3. Zhang Y, Wang Z, Shi B, et al. Effect of gingival mesenchymal stem cell-derived exosomes on inflammatory macrophages in a high-lipid microenvironment[J]. International Immunopharmacology, 2021, 94(9499):107455. IF:4.932
4. Alsayyah A, ElMazoudy R, Al-Namshan M, et al. Chronic neurodegeneration by aflatoxin B1 depends on alterations of brain enzyme activity and immunoexpression of astrocyte in male rats[J]. Ecotoxicology and environmental safety, 2019, 182: 109407. IF:4.527
5. Faheem M. Synthesis and Biological Evaluation of Benzimidazole Derivatives as Potential Neuroprotective Agents in an Ethanol-Induced Rodent Model[J]. ACS Chemical Neuroscience, 2021, 12(3):489−505. IF:4.418
6. Ren F , Xu X , Xu J B , et al. Compound essential oils relieve oxidative stress caused by PM 2. 5 exposure by inhibiting autophagy through the AMPK / mTOR pathway[J]. Environmental Toxicology, 2021 Sep; 36(9):1765-1774. IF:4.119
7. Mohsin Alvi A, Tariq Al Kury L, Umar Ijaz M, et al. Post-Treatment of Synthetic Polyphenolic 1, 3, 4 Oxadiazole Compound A3, Attenuated Ischemic Stroke-Induced Neuroinflammation and Neurodegeneration[J]. Biomolecules, 2020, 10(6): 816. IF:4.082
8. Darband S G, Sadighparvar S, Yousefi B, et al. Quercetin attenuated oxidative DNA damage through NRF2 signaling pathway in rats with DMH induced colon carcinogenesis[J]. Life sciences, 2020(253-). IF:3.708
9. Shah F A, Ali T, Khan A U. Potent Natural Antioxidant Carveol Attenuates MCAO-induced Oxidative stress, Neurodegeneration by Regulating the Nrf-2 pathway[J]. Frontiers in Neuroscience, 2020, 14: 659. IF:3.707
10. Amany Abdel-Rahman Mohamed , Safaa I. Khater , Ahmed Hamed Arisha , et al. Chitosan-stabilized selenium nanoparticles alleviate cardio-hepatic damage in type 2 diabetes mellitus model via regulation of caspase, Bax/Bcl-2, and Fas/FasL-pathway[J]. Gene, 2020, 768(7):145288. IF:3.688