

(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℃ 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	酶试剂 1 (Enzyme Reagent 1)	粉剂×1 支	-20℃ 避光 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	缓冲液 (Buffer Solution)	10 mL×1 瓶	-20℃ 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	酶试剂 2 (Enzyme Reagent 2)	粉剂×1 支	-20℃ 避光 保存 6 个月
试剂五 (Reagent 5)	探针 (Probe)	0.25mL×1 支	-20℃ 避光 保存 6 个月
试剂六 (Reagent 6)	标准品 (Standard)	粉剂×1 瓶	-20℃ 保存 6 个月
	96 孔黑色酶标板	1 板	
	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℃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℃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℃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℃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℃ 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℃ 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 $^{\circ}\text{C}$ 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 $^{\circ}\text{C}$ 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 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min				
反应工作液(μL)	50	50	50	50
振板 10 s, 37 $^{\circ}\text{C}$ 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: $y = ax + b$

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

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

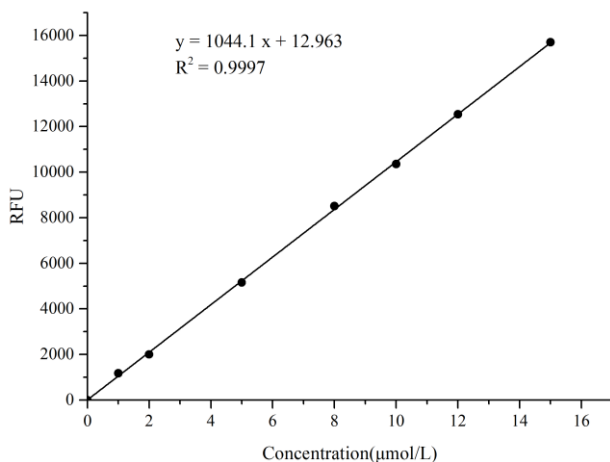
检测范围	0.15-15 $\mu\text{mol/L}$	平均批间差	6.5 %
灵敏度	0.15 $\mu\text{mol/L}$	平均批内差	2.3 %
平均回收率	96 %		

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 ($\mu\text{mol/L}$)	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:

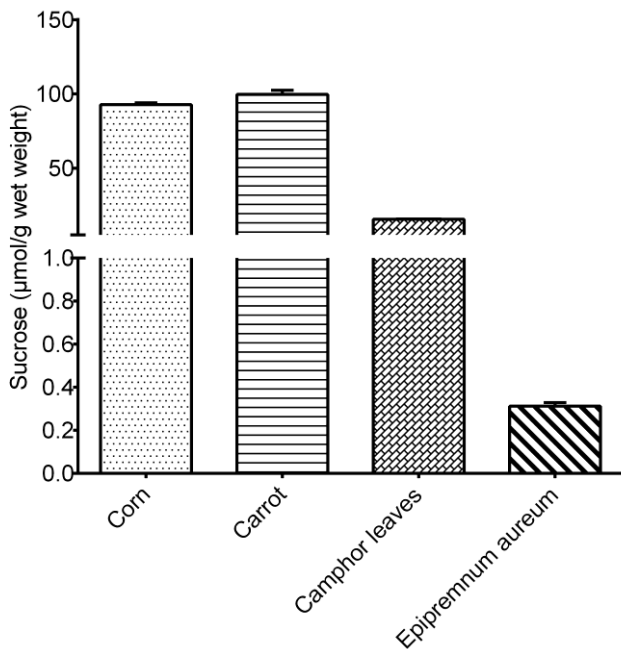
样本的绝对荧光值计算结果为:

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

样本的蔗糖含量计算结果为:

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

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

