

山梨醇含量测定说明书

(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°C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 3.5mL×1 支	4°C保存	
标准品	粉体 mg×1 支	4°C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°C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°C×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°C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°C×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 (10⁴)：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、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°C）。

② 在 EP 管中依次加入：

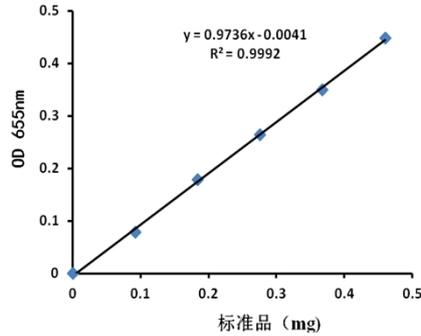
试剂名称 (μL)	测定管	空白管 (只做一次)
试剂一	35	35
试剂二	35	35
样本	230	
蒸馏水		230

震荡显色 15min, 12000rpm、室温 (25°C) 离心 5min, 取 200 μ L
上清液至 96 孔板中, 于 655nm 处读取吸光值 A,
 $\Delta A = A$ 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 100 μ L, 则补加 130 μ L 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: $y = 0.9736x - 0.0041$, x 是标准品质量 (mg), y 是 ΔA 。



2、按样本鲜重计算:

$$\text{山梨醇含量(mg/g)} = [(\Delta A + 0.0041) \div 0.9736] \div (W \times V1 \div V) \times D = 4.47 \times (\Delta A + 0.0041) \div W \times D$$

3、按细菌或细胞密度计算:

$$\begin{aligned} \text{山梨醇含量(mg / } 10^4 \text{ cell)} &= [(\Delta A + 0.0041) \div 0.9736] \div (500 \times V1 \div V) \times D \\ &= 0.009 \times (\Delta A + 0.0041) \times D \end{aligned}$$

4、按液体体积计算:

$$\text{山梨醇含量(mg/mL)} = [(\Delta A + 0.0041) \div 0.9736] \div V1 \times D = 4.47 \times (\Delta A + 0.0041) \times D$$

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 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, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0mg/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。