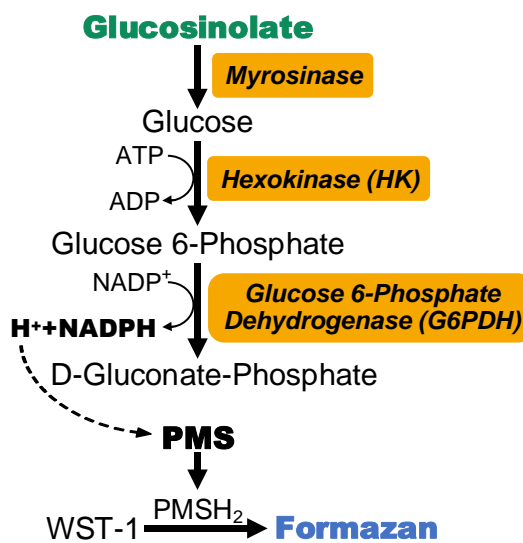




硫代葡萄糖苷含量检测试剂盒
Glucosinolate Content Assay Kit



北京盒子生工科技有限公司
Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.



硫代葡萄糖苷含量检测试剂盒

Glucosinolate Content Assay Kit

一、产品描述

硫代葡萄糖苷 (Glucosinolate) 又称芥子油苷或硫苷，是一类广泛存在于十字花科植物中的次生代谢产物，在植物体内以稳定的形式存在，当受到机械损伤或生物侵害时，会被黑芥子酶等酶水解生成多种降解产物，如异硫氰酸酯、硫苷酸等，降解产物具有抗菌、抗病虫害、抗氧化和抗癌等多种生物活性，其含量的测定在植物防御机制研究以及食品和医药产品开发等领域具有重要意义。

黑芥子酶能够催化硫代葡萄糖苷水解生成葡萄糖，进一步通过己糖激酶 (HK) 和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 (G6PDH) 依次将葡萄糖催化生成葡萄糖酸磷酸盐，同时伴随 NADP 还原为 NADPH，NADPH 可通过 1-mPMS 递氢作用，还原 WST-1 生成甲臞 (Formazan)，产物在 450 nm 处具有特征吸收峰，通过吸光值变化即可定量检测硫代葡萄糖苷的含量。

二、产品内容

名称	试剂规格	储存条件	使用说明及注意事项
提取液	液体 70 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂一	液体 30 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂二	液体 10 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂三	粉剂×1 瓶	-20°C 保存	使用前加入 2 mL 蒸馏水充分溶解 (分装后-20°C可保存 1 个月，避免反复冻融)
试剂四	液体 55 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂五	液体 8 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂六	组分 A	粉剂×1 支	在组分 B 中加入 8 mL 蒸馏水充分溶解 再加入组分 A 充分溶解 (分装后-20°C可保存 1 个月，避免反复冻融)
	组分 B	粉剂×1 瓶	
试剂七	粉剂×4 支	-20°C 保存	使用前每支加入 500 μL 蒸馏水充分溶解 (分装后-20°C可保存 1 个月，避免反复冻融)
试剂八	粉剂×4 支	-20°C 保存	使用前每支加入 500 μL 蒸馏水充分溶解 (分装后-20°C可保存 1 个月，避免反复冻融)
标准品 A	粉剂×1 支	4°C 保存	使用前加入 1 mL 蒸馏水充分溶解 (即为 10 mg/mL 葡萄糖标准液)
标准品 B	粉剂×1 支	-20°C 保存	使用前加入 1 mL 蒸馏水充分溶解 (即为 15 μmol/mL 硫代葡萄糖苷标准液)

三、产品使用说明

测定过程中所需要的仪器和试剂: 可见分光光度计、1 mL 玻璃比色皿 (光径 10 mm、狭缝 3 mm、体积 1.05 mL)、研钵/组织研磨仪、可调式移液器、台式离心机、恒温水浴/培养箱、**2 mL 离心管**、**5 mL 离心管**和 **10 mL 离心管**。

1. 待测样本的制备 (可根据预实验结果适当调整样本量及比例)

称取 200 mg 样本至 5 mL 离心管中, 加入 2 mL 提取液充分混匀, 沸水浴处理 10 min (期间振荡混匀 2-3 次), 冷却至室温, 研钵或组织匀浆仪研磨至匀浆, 12000 g 常温离心 10 min, 取上清即为待测样本, 置于冰上待测。

注: 沸水浴处理过程中注意密封以防止水分散失, 推荐使用螺纹盖离心管或冻存管。

2. 测定步骤

2.1 还原糖含量的预判定 (待测样本稀释倍数的确定)

① 设备准备

分光光度计预热 30 min 以上, 调节波长至 540 nm, 蒸馏水调零。

② 标准稀释液 A 的制备 (现配现用)

将 10 mg/mL 葡萄糖标准液使用蒸馏水稀释至 0.8 mg/mL, 充分混匀即为**标准稀释液 A**。

③ 样本稀释液的制备

将待测样本使用**提取液**稀释 6.25 倍 (D): 可以参考吸取 40 μ L 待测样本, 加入 210 μ L 提取液充分混匀, 即为**样本稀释液**。

④ 在离心管中依次加入下列试剂

试剂	测定管 (μ L)	标准管 (μ L)
样本稀释液	100	-
标准稀释液 A	-	100
试剂一	900	900
沸水浴处理 5 min, 冷却至室温		

注: 沸水浴处理过程中注意密封以防止水分散失。

吸光值测定: 将反应液置于 1 mL 玻璃比色皿中, 测定 540 nm 处吸光值, 记为 A 测定和 A 标准;

注: 标准管只需测定 1-2 次。

⑤结果判定

- 若 A 测定 \leq A 标准：可确定稀释倍数 D 为适宜稀释倍数，即样本稀释液可以用于后续实验；
- 若 A 测定 $>$ A 标准：则需扩大待测样本稀释倍数 (D)，使 A 测定 \leq A 标准，最终确定适宜稀释倍数 D，即最终确定的样本稀释液可以用于后续实验。

【结果判定说明】待测样本中葡萄糖的存在会对后续检测产生干扰，因此需将待测样本中葡萄糖清除后再进行硫代葡萄糖苷含量测定，后续将在“2.2 样本稀释液中葡萄糖的清除”步骤清除待测样本中葡萄糖，但此步骤葡萄糖最大清除量为 5 mg/mL，因此需要保证样本稀释液中葡萄糖含量应低于 5 mg/mL；“2.1 还原糖含量的预判定”采用 DNS 法首先确定样本稀释液中葡萄糖的含量：若 A 测定 \leq A 标准，即可保证样本稀释液中的葡萄糖含量低于 5 mg/mL，在后续清除反应中可被完全清除；若 A 测定 $>$ A 标准，即需要扩大待测样本稀释倍数，使样本稀释液中的葡萄糖含量低于 5 mg/mL，确保在后续清除反应中可被完全清除。

2.2 样本稀释液中葡萄糖的清除

按照 2.1 步骤中确定的待测样本稀释倍数 (D) 制备 **1.2 mL 样本稀释液** 至 5 mL 或 10 mL 离心管中，加入 **300 μ L 试剂二** 充分混匀，37°C 恒温反应 16 h（为便于实验安排，时间可适当延长，最长可延长至 24 h），反应结束后沸水浴处理 10 min（密封以防止水分散失），12000 g 常温离心 10 min，取上清记为上清液 A；

2.3 硫代葡萄糖苷含量测定

①设备准备

分光光度计预热 30 min 以上，调节波长至 450 nm，蒸馏水调零。

②试剂预热

试验前将**试剂四**置于 37°C 预热 10 min 以上。

③标准稀释液 B 的制备（现用现配）

将 15 μ mol/mL 硫代葡萄糖苷标准液使用蒸馏水稀释至 1.0、0.8、0.4、0.2、0.1、0.05、0.025 μ mol/mL，充分混匀即为**标准稀释液 B**。

序号	1	2	3	4	5	6	7
稀释前浓度 (μ mol/mL)	15	1.0	0.8	0.4	0.2	0.1	0.05
标准液体积 (μ L)	100	800	500	500	500	500	500
蒸馏水体积 (μ L)	1400	200	500	500	500	500	500
稀释后浓度 (μ mol/mL)	1.0	0.8	0.4	0.2	0.1	0.05	0.025

④在离心管中依次加入下列试剂

试剂	测定管 (μL)	对照管 (μL)	标准管 (μL)	空白管 (μL)
上清液 A	450	450	-	-
标准稀释液 B	-	-	135	-
蒸馏水	-	50	-	135
试剂三	50	-	15	15
充分混匀, 37°C恒温反应 60 min; 沸水浴处理 10 min, 冷却至室温; 12000 g 常温离心 10 min, 取上清即为上清液 B;				
上清液 B	100	100	100	100
试剂四	650	650	650	650
试剂五	100	100	100	100
试剂六	100	100	100	100
试剂七	25	25	25	25
试剂八	25	25	25	25
充分混匀, 37°C恒温反应 10 min				

注: 沸水浴处理过程中注意密封以防止水分散失。

吸光值测定: 将反应液置于 1 mL 玻璃比色皿中, 测定 450 nm 处吸光值, 记为 A 测定、A 对照、A 标准和 A 空白; 计算 ΔA 测定 = A 测定 - A 对照, ΔA 标准 = A 标准 - A 空白。注: 每个样本均需设一个对照管, 标准管和空白管只需测定 1-2 次。

标准曲线的建立: 以 1.0、0.8、0.4、0.2、0.1、0.05、0.025 $\mu\text{mol/mL}$ 标准稀释液浓度为横坐标 (x), 以其对应的 ΔA 标准为纵坐标 (y), 绘制标准曲线, 得到标准方程 $y=kx+b$, 将 ΔA 测定带入公式中得到 x ($\mu\text{mol/mL}$)。

3. 硫代葡萄糖苷含量计算

$$\text{硫代葡萄糖苷含量 } (\mu\text{mol/g}) = \frac{x \times V_1 \times V_2 \times D}{V_3 \times W} = \frac{2.5 \times x \times D}{W}$$

注释: V_1 : 2.2 步骤中上清液 A 的总体积, 1.5 mL; V_2 : 待测样本总体积, 2 mL; V_3 : 2.2 步骤中加入样本稀释液的体积, 1.2 mL; D: 2.1 步骤中确定的待测样本稀释倍数; W: 样本质量, g。

四、注意事项

①若 ΔA 测定小于 0.02, 建议适当增加上清液 B 加入量后再进行测定 (最大可增加至 500 μL), 根据上清液 B 增加量对应减少试剂四的加入量, 其它试剂用量不变, 计算时相应修改; 例如: 上清液 B 体积由 100 μL 增加至 200 μL , 试剂四体积由 650 μL 减少至 550 μL , 最终计算结果除以 2 即可;

②为保证结果准确且避免试剂损失, 测定前请仔细阅读说明书 (以实际收到说明书内容为准), 确认试剂储存和准备是否充分, 操作步骤是否清楚, 且务必取 2-3 个预期差异较大的样本进行预测定, 过程中问题请您及时与工作人员联系。

For Research Use Only. Not for Use in Diagnostic Procedures.

boxbio

Manufactured and Distributed by

Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.
Liandong U Valley, Tongzhou District, Beijing, China

TEL: 400-805-8228

E-MAIL: techsupport@boxbio.cn

Copyright © 2020 Boxbio, All Rights Reserved.

