

可溶性糖含量试剂盒说明书

(货号: BP10259W 微板法 96 样 有效期: 9 个月)

一、指标介绍:

糖类物质是构成植物体的重要组成成分之一,也是新陈代谢的主要原料和贮存物质。糖类在浓硫酸作用下经脱水反应生成糠醛或羟甲基糠醛,生成的糠醛或羟甲基糠醛与蒽酮脱水缩合,形成糠醛的衍生物,呈蓝绿色物质,其在可见光区 620nm 波长处有最大吸收,且其光吸收值在一定范围内与糖的含量成正比关系。该方法用于可溶性单糖、寡糖和多糖的含量测定,具有灵敏度高、简便快捷、适用于微量样品的测定等优点。

该方法的特点是几乎可以测定所有的糖类(包括单糖:戊糖、已糖、蔗糖、糖原、多缩葡萄糖等),所以用该方法测出的糖类含量是溶液中全部可溶性糖类含量。

二、试剂盒组分与配制:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
试剂一	粉剂×2 瓶	4℃避光保存	
试剂二	液体 5mL×1 瓶	4℃避光保存	
标准品	粉剂×1 支	4℃保存	1. 若重新做标曲,则用到该试剂; 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制; 3. 溶解后的标品一周内用完。

工作液配制:吸取 2mL 试剂二加入到一支试剂一中,混匀并充分溶解,即得工作液。

(如难溶解,可超声溶解或者 60℃水浴溶解;剩余试剂 4℃保存一周)。

三、实验器材:

研钵(匀浆机)、冰盒(制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅(烘箱、培养箱、金属浴)、96 孔板、离心管、酶标仪、乙醇、浓硫酸(不允许快递)、蒸馏水(去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本(例如不同类型或分组)进行预实验,熟悉操作流程,根据预实验结果确定或调整样本浓度,以防造成样本或试剂不必要的浪费!

建议:选取样本做几个梯度的稀释,选取适合本次实验的稀释倍数 D。

① 组织样本:

称取 0.1g 样本(若是干样,如烘干烟叶等可取 0.05g;若是水分充足的样本可取 0.2g),先加入 0.8mL 的 80%乙醇(自备:取 80mL 乙醇溶于 20mL 蒸馏水中),冰浴匀浆,倒入有盖离心管中,再用 80%乙醇冲洗研钵并转移至同一 EP 管中,使 EP 管中粗提液终体积定容为 1.5mL(若用自动研磨机可直接加入 1.5mL 的 80%乙醇研磨);置 50℃水浴 20min(封口膜缠紧,防止液体散失,且间隔 2min 振荡混匀一次),冷却后(若有损失,可加 80%乙醇补齐至 1.5mL),12000rpm,室温离心 10min,取上清液备用。

【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 万细菌或细胞至 EP 管中,加入 1.5mL 的 80%乙醇(自备:取 80mL 乙醇溶于 20mL 蒸馏水中)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);置 50℃水浴 20min(封口膜缠紧,防止液体散失,且间隔 2min 振荡混匀一次),冷却后(若有损失,可加 80%乙醇补齐至 1.5mL),12000rpm,室温

离心 10min，取上清液备用。

【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 的比例进行提取。

③ 液体样本：

澄清的液体样本直接检测，若浑浊则需 12000rpm，室温离心 10min，取上清液备用。

2、检测步骤：

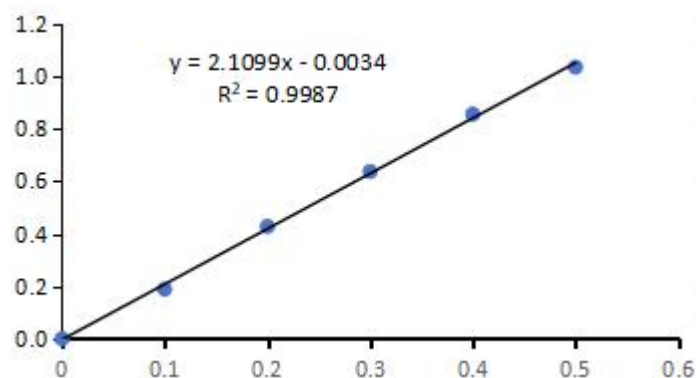
- ① 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 620nm。
- ② 调节水浴锅至 95-100℃，工作液用前需完全溶解。
- ③ 提示：大多数样本可溶性糖含量较高，为使 ΔA 值在 1 以内，实验前可选取几个样本做预测定，用蒸馏水把上清液稀释成不同浓度，找出适合本次检测样本的稀释倍数 D。（强调：严禁稀释加热反应后的混合液，否则会出现浑浊现象）。
- ④ 在 EP 管中依次加入：

试剂（ μL ）	测定管	空白管（仅做一次）
样本	25	0
蒸馏水	75	100
工作液	30	30
浓硫酸(缓慢加入)	250	250
混匀后，放入 95-100℃水浴中 10min（封口膜缠紧，防止水分散失），冷却至室温后，取 200 μL 转移至 96 孔板中，于 620nm 读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{空白管}}$ 。		

【注】 若 ΔA 的值接近零，可增加样本加样体积 V1（如由 25 μL 增至 50 μL ，则蒸馏水相应减少），则改变后的 V1 代入公式重新计算。

五、结果计算：

1、标准方程为 $y = 2.1099x - 0.0034$ ；x 为标准品浓度（mg/mL），y 为吸光值 ΔA 。



2、按样本重量计算：

$$\begin{aligned} \text{可溶性糖}(\text{mg} / \text{g} \text{ 重量}) &= [(\Delta A + 0.0034) \div 2.1099 \times V1] \div (W \times V1 \div V) \times D \\ &= 0.711 \times (\Delta A + 0.0034) \div W \times D \end{aligned}$$

3、按质量分数（%）计算：

$$\begin{aligned} \text{可溶性糖}(\% \text{ 重量}) &= [(\Delta A + 0.0034) \div 2.1099 \times V1] \div (W \times V1 \div V) \times 10^{-3} \times 100\% \\ &= [0.711 \times (\Delta A + 0.0034) \div W \times D] \% \end{aligned}$$

4、按照样本蛋白浓度计算：

$$\begin{aligned} \text{可溶性糖}(\text{mg} / \text{mg} \text{ prot}) &= [(\Delta A + 0.0034) \div 2.1099 \times V1] \div (Cpr \times V1 \div V) \times D \\ &= 0.711 \times (\Delta A + 0.0034) \div Cpr \times D \end{aligned}$$

$$\text{可溶性糖}(\%) = [(\Delta A + 0.0034) \div 2.1099 \times V1] \div (Cpr \times V1 \div V) \times 10^{-3} \times 100\%$$

$$=[0.0711 \times (\Delta A + 0.0034) \div C_{pr} \times D] \%$$

5、按细菌/细胞数量计算：

$$\begin{aligned} \text{可溶性糖}(\text{mg} / 10^4 \text{cell}) &= [(\Delta A + 0.0034) \div 2.1099 \times V_1] \div (500 \times V_1 \div V) \times D \\ &= 0.00142 \times (\Delta A + 0.0034) \times D \end{aligned}$$

6、按液体体积计算：

$$\text{可溶性糖}(\text{mg/mL}) = (\Delta A + 0.0034) \div 2.1099 \times D = 0.474 \times (\Delta A + 0.0034) \times D$$

V---样品提取液总体积， 1.5mL； V1---测定时所取样本的体积， 0.025mL；

W---样本质量， g； 500---细胞数量， 万；

D---自行稀释倍数， 未稀释即为 1。

附：标准曲线制作过程：

- 1 从标准品管中称量取出 2mg 至一新 EP 管中，再加 2mL 蒸馏水混匀溶解即 1mg/mL 的标准品（母液需在两天内用且-20℃保存）。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5. mg/mL。也可根据实际样本调整标准品浓度。

- 2 标品稀释参照表如下：

吸取标准品母液 500uL，加入 500uL 蒸馏水，混匀得到 0.5mg/mL 的标品稀释液待用。						
标品浓度 mg/mL	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
标品稀释液 uL	0	40	80	120	160	200
水 uL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

- 3 依据测定管加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。

试剂名称 (μL)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	25	
蒸馏水	75	100
工作液	30	30
浓硫酸(缓慢加入)	250	250
混匀，置 95℃水浴中 10min（盖紧，以防止水分散失），冷却至室温后，取 200μL 转移至 96 孔板中，于 620nm 读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{测定-0 浓度管}}$ 。		