

还原糖含量试剂盒说明书

(货号: BP10261W 微板法 96 样 有效期: 9 个月)

一、指标介绍:

还原糖广泛存在于动物、植物、微生物和培养细胞中。植物体内的还原糖主要包括葡萄糖、果糖和麦芽糖等, 是最常见的单糖和双糖。

在碱性条件下, DNS 试剂与还原糖共热生成棕红色氨基化合物, 经过 480nm 到 540nm 波长扫描发现在 500nm 有特征吸收峰; 在一定的浓度范围内, 还原糖含量与 500nm 吸光度成线性关系, 根据标准曲线, 即可求出样品中还原糖的量。

二、测试盒组成和配制:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
试剂一	液体 12mL×1 瓶	4℃避光保存	
标准品	粉体 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。

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、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!

1、样本提取:

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 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 500nm。

② 调节水浴锅至 95℃。

③ 上清液稀释: 可先取 2 个样本检测, 确定适合本批样本的稀释浓度 D: 叶片类样本可稀释 10 倍, 含糖量高的果肉类样本可稀释 20 倍左右。

④ 在 EP 管中加入下列试剂:

试剂 (μL)	测定管	空白管 (仅做一次)
样本	100	
蒸馏水		100
试剂一	100	100

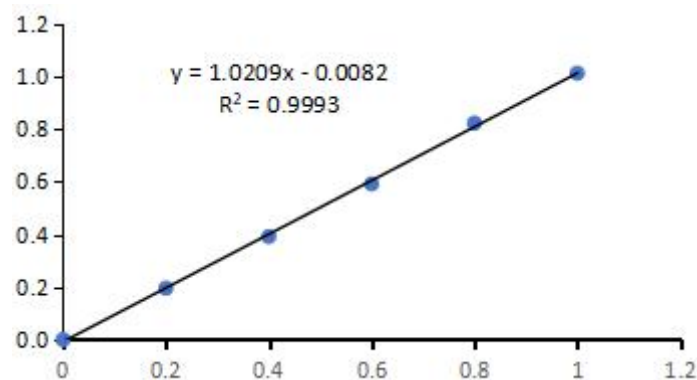
混匀，在 95℃水浴中加热 10min（盖紧封口，防止水分散失），取出后立即过冷水冷却至室温。		
蒸馏水	1000	1000
混匀，取 200μL 于 96 孔板中，500nm 读取吸光值 A， $\Delta A = A - \text{测定} - A - \text{空白}$ 。		

【注】：1.若 ΔA 值大于 1，样本可用蒸馏水稀释后再测定，稀释倍数 D 代入计算公式计算。

2.若 ΔA 值小于 0.01，则可加大样本加样体积 V1（如由 100μL 增至 200μL，则最后一步的蒸馏水相应减少，样本相当于浓缩 2 倍，则计算公式需除以 2；或增加样本取样质量 W，则改变后的 W 需带入公式计算。

五、结果计算：

1、标准曲线方程为 $y = 1.0209x - 0.0082$ ；x 为标准品浓度（mg/mL），y 为吸光值 ΔA 。



2、按样本重量计算：

$$\text{还原糖}(\text{mg/g 重量}) = [(\Delta A + 0.0082) \div 1.0209 \times V1] \div (W \times V1 \div V) \times D = 1.469 \times (\Delta A + 0.0082) \div W \times D$$

按照蛋白浓度计算：

3、按照蛋白浓度计算：

$$\text{还原糖}(\text{mg/mg prot}) = [(\Delta A + 0.0082) \div 1.0209 \times V1] \div (Cpr \times V1 \div V) \times D = 1.469 \times (\Delta A + 0.0082) \div Cpr \times D$$

4、按质量分数（%）计算：

$$\begin{aligned} \text{还原糖}(\% \text{重量}) &= [(\Delta A + 0.0082) \div 1.0209 \times V1] \div (W \times V1 \div V) \times 10^{-3} \times 100\% \\ &= [0.1469 \times (\Delta A + 0.0082) \div W \times D]\% \end{aligned}$$

5、按液体体积计算：

$$\text{还原糖}(\text{mg/mL}) = (\Delta A + 0.0082) \div 1.0209 \times D = 0.98 \times (\Delta A + 0.0082) \times D$$

V---样品提取液总体积，1.5mL； V1---测定时所取样本的体积，0.1mL；

W---样本质量，g； 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 的葡萄糖（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, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1. 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：

标品浓度 mg/mL	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1
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	100	
蒸馏水		100
试剂一	100	100
混匀，在 95°C 水浴中加热 10min (盖紧封口，防止水分散失)， 取出后立即过冷水冷却至室温。		
蒸馏水	1000	1000
混匀，取 200μL 于 96 孔板中，500nm 读取吸光值 A， $\Delta A = A$ 测定-0 浓度管。		