

总糖含量试剂盒说明书

(货号: BP10262W 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。总糖也可称为碳水化合物,包括可溶性的单糖,二糖以及不溶性的淀粉,纤维素,几丁质等。

总糖酸水解为还原糖,在碱性条件下,DNS 试剂与还原糖共热后被还原成氨基化合物,在过量的 NaOH 碱性溶液中呈桔红色,经过 500nm 到 540nm 波长扫描在 500nm 处有最大吸收峰,并且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,以此测定样品中的还原糖含量,即样品中的总糖含量。

二、试剂盒的组成和配制:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 80mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	空瓶×1 个	4℃保存	1. 临用前加 30mL 水; 2. 再向水中缓慢加入 30mL 的市售盐酸(盐酸有腐蚀性,加的过程中需缓慢谨慎加入),混匀备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂二	液体 60mL×1 瓶	4℃保存	
试剂三	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、盐酸、蒸馏水(去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定,熟悉实验流程,避免实验样本和试剂浪费!

1、样本提取:

① 组织样本:称取约 0.1g 样品(水分充足的样本可取 0.5g)至 EP 管中,加入 750μL 提取液,匀浆后再加 500μL 试剂一,封口置于 90℃水浴中加热 30min,并且 15min 振荡一次,用冷水冷却至室温,加入 500μL 试剂二,用蒸馏水定容至 2mL,混匀,12000rpm,25℃离心 10min,取上清液备用。

【注】:若增加样本量,可按照组织质量(g):蒸馏水体积(mL)为 1:5~10 的比例进行提取

② 液体样本:取 0.1mL 液体样本至 EP 管中,加入 400μL 试剂一混匀,封口置于 90℃水浴中 30min,并且 15min 振荡一次,用冷水冷却至室温,再加入 400μL 试剂二混匀,最终用蒸馏水定容至 1mL,混匀,12000 rpm,25℃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 提示:大多数样本总糖含量较高,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。

③ 调节水浴锅至 95℃。在 EP 管中依次加入：

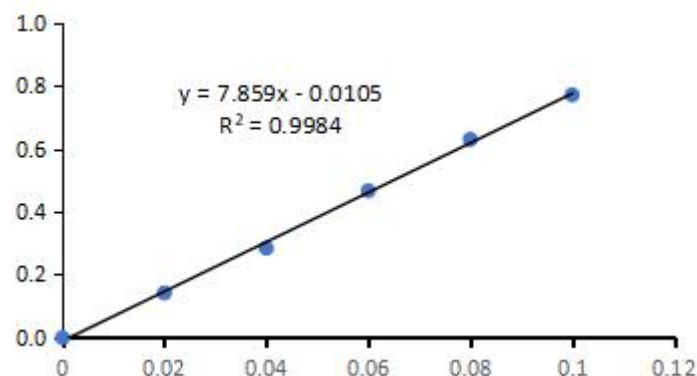
试剂 (μL)	测定管	空白管 (仅做一次)
样本	100	
蒸馏水		100
试剂三	100	100
混匀, 在 95℃水浴中 10min (盖紧封口, 以防止水分散失), 取出后立即过冷水冷却至室温。		
蒸馏水	1000	1000
混匀, 取 200μL 于 96 孔板中, 500nm 读取吸光值 A, $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$ 。		

【注】：1.若 ΔA 值大于 1.5, 样本可用蒸馏水再行稀释, 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 $y = 7.859x - 0.0105$; x 为标准品质量 (mg), y 为 ΔA 。



2、按样本鲜重计算：

$$\text{总糖(mg/g 重量)} = [(\Delta A + 0.0105) \div 7.859] \div (W \times V1 \div V) \times D = 2.54 \times (\Delta A + 0.0105) \div W \times D$$

3、按样本蛋白浓度计算：

$$\text{总糖(mg/mg prot)} = [(\Delta A + 0.0105) \div 7.859] \div (Cpr \times V1 \div V) \times D = 2.54 \times (\Delta A + 0.0105) \div Cpr \times D$$

4、按液体体积计算：

$$\text{总糖(mg/mL)} = [(\Delta A + 0.0105) \div 7.859] \div [V2 \times V1 \div V3] \times D = 12.72 \times (\Delta A + 0.0105) \times D$$

V---组织样品的提取液总体积, 2mL; V1---测定体系中样本加样体积, 0.1mL;
V2---液体样品取样量, 0.1mL; V3---液体样本的提取液总体积, 1mL;
W---样本质量, g; D---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
试剂三	100	100
混匀，在 95°C 水浴中 10min（盖紧封口，以防止水分散失），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。		