

多糖含量试剂盒说明书

(货号: BP10263W 微板法 96 样 有效期: 9 个月)

一、指标介绍:

糖在浓硫酸作用下, 水解生成单糖, 并迅速脱水生成糖醛衍生物, 然后与苯酚缩合成橙黄色化合物, 且颜色稳定, 在波长 488 nm 处和一定的浓度范围内, 其吸光度与多糖含量呈线性关系正比, 再利用标准曲线定量算出样品中的多糖含量。

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	液体 2mL×3 支	4℃ 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。

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 多糖待检液制备:

a. 组织样本:

- ① 若是烘干且研磨过 40 目筛后的样本, 称取 3mg 过筛后细末至 2mLEP 管中, 加入 2mL 蒸馏水; (若是鲜样则可取 0.1g 或 0.5g (水份足的样本) 至 2mLEP 管中, 加入 2mL 蒸馏水), 于沸水浴 (95-100℃) 加热 2 小时 (若放在金属浴上面可用重物压盖防止 EP 管崩开; 间隔 20min 带防护手套轻轻晃动混匀几下), 加热结束后取出放置至室温 (中间过程液体若挥发严重, 最后可用蒸馏水定容到 2mL), 最后于 8000rpm 室温离心 5min, 上清液待用。
- ② 取 0.2mL 上步离心后的上清液至新 EP 管中, 再加入 1mL 乙醇混匀, 于 4℃ 放置 1 小时, 取出后 8000rpm 离心 5min 后弃上清, 留沉淀;
- ③ 上步所得沉淀中再加入 1mL 80% 乙醇混匀几下 (自备: 取 80mL 乙醇溶于 20mL 蒸馏水中), 8000rpm 离心 5min 后弃上清, 留沉淀 (可采用使 EP 管轻轻倒置于吸水纸上约 5min 吸干剩余上清液, 尽量避免沉淀损失);
- ④ 向上步所得沉淀中加入 2mL 蒸馏水, 于沸水浴 (95-100℃) 加热直到沉淀全部溶解 (约 5min) 即多糖待检液。

b. 液体样本:

- ① 取 0.2mL 液体 (可先做两个样本预测定, 确定适合本批液体样本取样量 V2), 至新 EP 管中, 再加入 1mL 乙醇混匀 (使乙醇在整个液体中占比至少 80%), 于 4℃ 放置 1 小时, 取出后 8000rpm 离心 5min 后弃上清, 留沉淀;
- ② 上步所得沉淀中再加入 1mL 80% 乙醇混匀几下 (自备: 取 80mL 乙醇溶于 20mL 蒸馏水中), 8000rpm 离心 5min 后弃上清, 留沉淀 (可采用使 EP 管轻轻倒置于吸水纸上约 5min 吸干剩余上清液,

尽量避免沉淀损失)；

- ③ 向上步所得沉淀中加入 2mL 蒸馏水，于沸水浴（95-100℃）加热直到沉淀全部溶解（约 5min）即多糖待检液。

2、检测步骤：

- ① 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 488nm，调节水浴锅或金属浴至 95-100℃。

- ② 在 EP 管中依次加入：

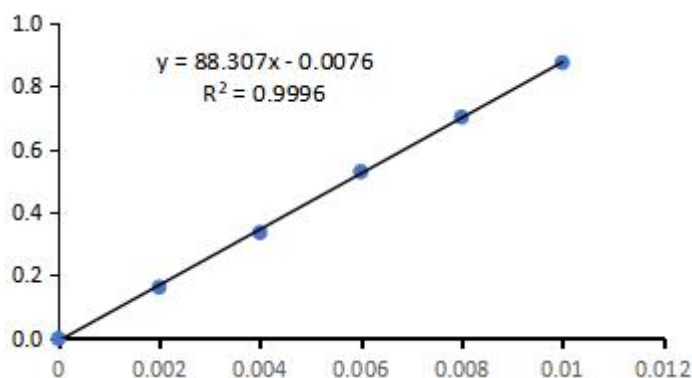
试剂 (μL)	测定管	空白管 (仅做一次)
多糖待检液	100	
蒸馏水		100
试剂一	50	50
浓硫酸(务必缓慢加入)	250	250
混匀后，放入 95℃水浴 20min（封口膜缠紧，防止水分散失），冷却至室温后，取 200μL 转移至 96 孔板中，于 488nm 读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{空白管}}$ 。		

【注】：1. 如果 ΔA 大于 1，需要将多糖待检液用蒸馏水稀释，计算公式中乘以相应稀释倍数 D。

2. 若 ΔA 值在零附近即低于 0.005，则可增加样本取样质量 W，则改变后的 W 需代入公式重新计算。

五、结果计算：

- 1、标准方程为 $y = 88.307x - 0.0076$ ；x 为标准品质量（mg），y 为吸光值 ΔA 。



- 2、按样本重量计算：

$$\text{多糖}(\text{mg/g 重量}) = [(\Delta A + 0.0076) \div 88.307] \div (W \times V_1 \div V) \times 10 \times D$$

$$= 2.265 \times (\Delta A + 0.0076) \div W \times D$$

- 3、按质量分数（%）计算：

$$\text{多糖}(\% \text{重量}) = [(\Delta A + 0.0076) \div 88.307] \div (W \times V_1 \div V) \times 10 \times D \times 10^{-3} \times 100\%$$

$$= [0.2265 \times (\Delta A + 0.0076) \div W \times D] \%$$

- 4、按照蛋白浓度计算：

$$\text{多糖}(\text{mg/mg prot}) = [(\Delta A + 0.0076) \div 88.307] \div (C_{\text{pr}} \times V_1 \div V) \times 10 \times D$$

$$= 2.265 \times (\Delta A + 0.0076) \div C_{\text{pr}} \times D$$

- 5、按液体体积计算：

$$\text{多糖}(\text{mg/mL 液体}) = [(\Delta A + 0.0076) \div 88.307] \div (V_2 \times V_1 \div V) \times D$$

$$= 0.2265 \times (\Delta A + 0.0076) \div V_2 \times D$$

V---样品提取液总体积，2mL； V1---测定时待检液体积，0.1mL；
V2---液体取样体积，mL； 10---②步中取 0.2mL 处理后变成 2mL 体积；
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°C 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, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1. 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：

吸取标准品母液 100uL，加入 900uL 蒸馏水，混匀得到 0.1mg/mL 的标品稀释液待用。						
标品浓度 mg/mL	0	0.02	0.04	0.06	0.08	0.1
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	50	50
浓硫酸(务必缓慢加入)	250	250
混匀放入 95°C 水浴 20min（封口膜缠紧，防止水分散失），冷却至室温后，取 200μL 转移至 96 孔板中，于 488nm 读取吸光值 A， $\Delta A = A$ 测定-0 浓度管。		