

食品（肉制品）中总糖含量检测试剂盒说明书

(货号: BP10314W 微板法 96 样 有效期: 6 个月)

一、指标介绍:

样本中的糖经热水提取后, 用硫酸脱水生成糠醛或糠醛衍生物。生成物与苯酚反应缩合成橙黄色物质, 该有色物质在 480nm 处有最大吸收, 在一定范围内其吸光度值同糖的浓度呈正比, 再利用标准曲线定量算出样本中总糖含量。

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 A	粉剂×2 瓶	4℃ 保存	每瓶: 1. 开盖前注意使粉剂落入底部 (可手动甩一甩); 2. 每瓶分别加 6mL 试剂 C 溶解备用, -20℃分装冻存。
试剂 B	液体×1 瓶	4℃避光保存	
试剂 C	液体×1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	粉剂×3 支	4℃ 保存	每支: 1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底 (可手动甩一甩); 2. 每支分别加 2mL 水溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
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、**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、总糖上清液制备:

① 组织样本:

称取 0.1g 样本至 2mLEP 管中, 加入 1mL 蒸馏水, 研磨匀浆, 于 95℃加热 30min (若放在金属浴上面可用重物压盖防止 EP 管崩开; 间隔 10min 带防护手套轻轻晃动混匀几下), 冷却后加水定容至 2mL, 12000rpm 室温离心 10min, 取上清液待测。

② 含淀粉的组织样本:

称取 0.1g 样本至 2mLEP 管中, 加入 1mL 蒸馏水, 研磨匀浆, 于 95℃加热 30min (若放在金属浴上面可用重物压盖防止 EP 管崩开; 间隔 10min 带防护手套轻轻晃动混匀几下), 加热后冷却

到 60°C, 加 0.1mL 试剂 A 混匀, 于 55°C 水浴 1h, 再加 20μL 试剂 B 混匀, 观察颜色, 若显蓝色, 再加 0.1mL 试剂 A 混匀, 再于 55°C 水浴 1h; 最后于 95°C 加热 5min, 冷却至室温后加水定容至 2mL, 12000rpm 室温离心 10min, 取上清液待测。

2、检测步骤:

① 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 480nm, 调节水浴锅或金属浴至 95-100°C。

② 在 EP 管中依次加入:

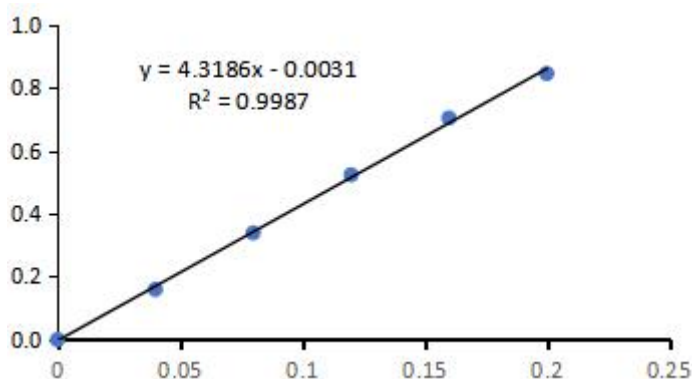
试剂 (μL)	测定管	空白管 (仅做一次)
样本	50	
蒸馏水		50
试剂一	50	50
浓硫酸(务必缓慢加入)	250	250
混匀后, 放入 95°C 水浴 20min (封口膜缠紧, 防止水分散失), 冷却至室温后, 取 200μL 转移至 96 孔板中, 于 480nm 读取吸光值 A, $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{空白管}}$ 。		

【注】:1. 如果 ΔA 大于 1, 需要将样本上清液用蒸馏水稀释, 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 0.01, 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 $y = 4.3186x - 0.0031$; x 为标准品质量 (mg/mL), y 为吸光值 ΔA 。



2、按样本重量计算:

$$\text{总糖(mg/g 重量)} = [(\Delta A + 0.0031) \div 4.3186 \times V1] \div (W \times V1 \div V) \times D = 0.463 \times (\Delta A + 0.0031) \div W \times D$$

3、按质量分数 (%) 计算:

$$\begin{aligned} \text{总糖(\%重量)} &= [(\Delta A + 0.0031) \div 4.3186 \times V1] \div (W \times V1 \div V) \times D \times 10^{-3} \times 100\% \\ &= [0.463 \times (\Delta A + 0.0031) \div W \times D]\% \end{aligned}$$

4、按照蛋白浓度计算:

$$\text{总糖(mg/mg prot)} = [(\Delta A + 0.0031) \div 4.3186 \times V1] \div (Cpr \times V1 \div V) \times D = 0.463 \times (\Delta A + 0.0031) \div Cpr \times D$$

V---样品提取液总体积, 2mL;

V1---测定时待检液体积, 0.05mL;

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, 0.04, 0.08, 0.12, 0.16, 0.2 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 200uL，加入 800uL 蒸馏水，混匀得到 0.2mg/mL 的标品稀释液待用。						
标品浓度 mg/mL	0	0.04	0.08	0.12	0.16	0.2
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	50	
蒸馏水		50
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），自然冷却至室温，取 200μL 转移至 96 孔板中，于 480nm 读取吸光值 A， $\Delta A = A - \text{测定-0 浓度管}$ 。		