

还原糖含量试剂盒说明书

(货号：ADS-F-TDX010-48 分光法 48 样 有效期：9 个月)

一、产品简介：

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：

试剂名称	规格	保存要求	备注
试剂一	液体 6mL×1 瓶	4°C避光保存	
标准品	粉体 1 支	4°C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、所需的仪器和用品：

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）、1ml 比色皿、离心管、分光光度计、乙醇、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，了解本批样品情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

1、样本制备：

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°C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、上机检测：

① 可见分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 500nm，蒸馏水调零。

② 调节水浴锅至 95°C。

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

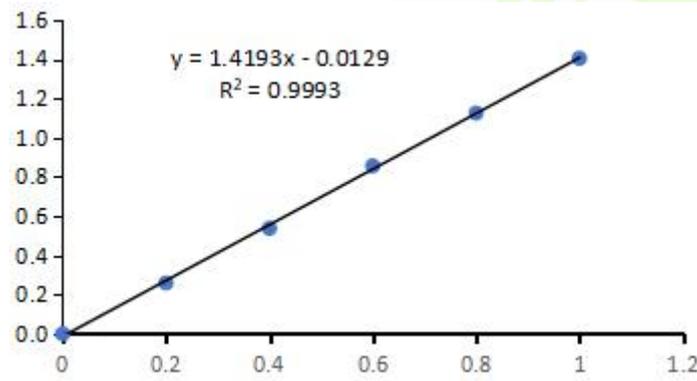
试剂一	100	100
混匀，在 95°C 水浴中加热 10min（盖紧封口，防止水分散失），取出后立即过冷水冷却至室温。		
蒸馏水	1000	1000
混匀，全部液体转移至 1mL 玻璃比色皿中，500nm 读取吸光值 A， $\Delta A = A - \text{测定} - A \text{ 空白}$ 。		

【注】：1.若 ΔA 值大于 1.5，样本可用蒸馏水再稀释，稀释倍数 D 代入公式计算。

2.若 ΔA 值小于 0.01，则可加大样本加样体积 V1（如由 100 μ L 增至 200 μ L，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 $y = 1.4193x - 0.0129$ ；x 为标准品浓度（mg/mL），y 为吸光值 ΔA 。



2、按样本重量计算：

$$\begin{aligned} \text{还原糖}(\text{mg/g 重量}) &= [(\Delta A + 0.0129) \div 1.4193 \times V1] \div (W \times V1 \div V) \times D \\ &= 1.057 \times (\Delta A + 0.0129) \div W \times D \end{aligned}$$

3、按质量分数（%）计算：

$$\begin{aligned} \text{还原糖}(\% \text{重量}) &= [(\Delta A + 0.0129) \div 1.4193 \times V1] \div (W \times V1 \div V) \times 10^{-3} \times 100\% \\ &= [0.1057 \times (\Delta A + 0.0129) \div W \times D] \% \end{aligned}$$

4、按照蛋白浓度计算：

$$\begin{aligned} \text{还原糖}(\text{mg/mg prot}) &= [(\Delta A + 0.0129) \div 1.4193 \times V1] \div (Cpr \times V1 \div V) \times D \\ &= 1.057 \times (\Delta A + 0.0129) \div Cpr \times D \\ \text{还原糖}(\%) &= [(\Delta A + 0.0129) \div 1.4193 \times V1] \div (Cpr \times V1 \div V) \times 10^{-3} \times 100\% \\ &= [0.1057 \times (\Delta A + 0.0129) \div Cpr \times D] \% \end{aligned}$$

5、按液体体积计算：

$$\text{还原糖}(\text{mg/mL}) = (\Delta A + 0.0129) \div 1.4193 \times D = 0.7046 \times (\Delta A + 0.0129) \times D$$

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；
Cpr---蛋白浓度（mg/mL）；建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。

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, 0.2, 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，全部液体转移至 1mL 玻璃比色皿中，500nm 读取吸光值 A， $\Delta A = A$ 测定-0 浓度管。		