

总糖含量试剂盒说明书

(货号: ADS-F-TDX030 分光法 48 样 有效期: 9 个月)

一、产品简介:

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:

| 试剂名称 | 规格 | 保存要求 | 备注 |
|------|-------------|---------|--|
| 提取液 | 液体 40mL×1 瓶 | 4°C保存 | |
| 试剂一 | 空瓶 1 个 | 4°C保存 | 1. 临用前加 15mL 水; 2. 再向水中缓慢加 15mL 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 30mL×1 瓶 | 4°C保存 | |
| 试剂三 | 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、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:称取约 0.1g 样品(水分充足的样本可取 0.5g)至 EP 管中,加入 750 μ L 提取液,匀浆后再加 500 μ L 试剂一,封口置于 90°C 水浴中加热 30min,并且 15min 振荡一次,用冷水冷却至室温,加入 500 μ L 试剂二,用蒸馏水定容至 2mL,混匀,12000rpm,25°C 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:取 0.1mL 液体样本至 EP 管中,加入 400 μ L 试剂一混匀,封口置于 90°C 水浴中 30min,并且 15min 振荡一次,用冷水冷却至室温,再加入 400 μ L 试剂二混匀,最终用蒸馏水定容至 1mL,混匀,12000 rpm,25°C 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 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°C,在 EP 管中依次加入:

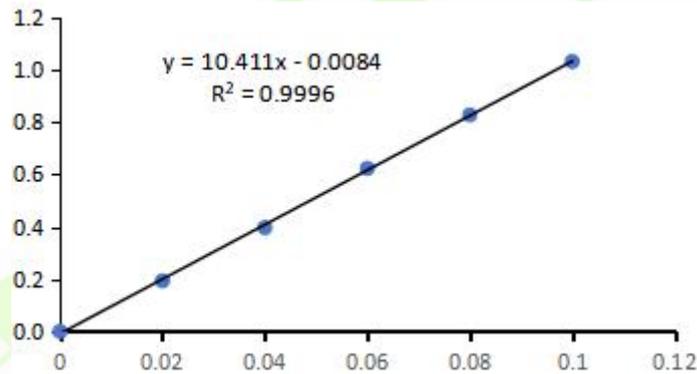
| 试剂 (μL) | 测定管 | 空白管 (仅做一次) |
|--|------|------------|
| 样本 | 100 | |
| 蒸馏水 | | 100 |
| 试剂三 | 100 | 100 |
| 混匀, 在 95°C 水浴中 10min (盖紧封口, 以防止水分散失), 取出后立即过冷水冷却至室温。 | | |
| 蒸馏水 | 1000 | 1000 |
| 混匀, 全部液体转移到 1mL 玻璃比色皿中, 500nm 读取吸光值 A, ΔA=A 测定-A 空白。 | | |

【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 $y=10.411x - 0.0084$; x 为标准品质量 (mg), y 为 ΔA。



2、按样本鲜重计算:

$$\text{总糖(mg/g 重量)} = [(\Delta A + 0.0084) \div 10.411] \div (W \times V1 \div V) \times D = 1.92 \times (\Delta A + 0.0084) \div W \times D$$

3、按样本蛋白浓度计算:

$$\text{总糖(mg/mg prot)} = [(\Delta A + 0.0084) \div 10.411] \div (Cpr \times V1 \div V) \times D = 1.92 \times (\Delta A + 0.0084) \div Cpr \times D$$

4、按液体体积计算:

$$\text{总糖(mg/mL)} = [(\Delta A + 0.0084) \div 10.411] \div [V2 \times V1 \div V3] \times D = 9.61 \times (\Delta A + 0.0084) \times D$$

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;

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