

总糖含量试剂盒说明书

(微板法 96 样)

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 80mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	空瓶×1 个	4°C保存	临用前加 30mL 水，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。
试剂二	液体 60mL×1 瓶	4°C保存	
试剂三	液体 12mL×1 瓶	4°C保存	
标准品	粉体 mg×1 支	4°C保存	若重新做标曲，则用到该试剂

三、所需的仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、水浴锅、可调式移液器、研钵、蒸馏水、盐酸。

四、总糖含量检测：

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），750 μ L 提取液，匀浆后加入 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）：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 液体样本加入 750 μ L 提取液，匀浆后加入 500 μ L 试剂一，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，加入 500 μ L 试剂二，用蒸馏水定容至 2mL，混匀，12000 rpm，25°C 离心 10min，取上清液备用。

2、上机检测：

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°C。在 EP 管中依次加入：

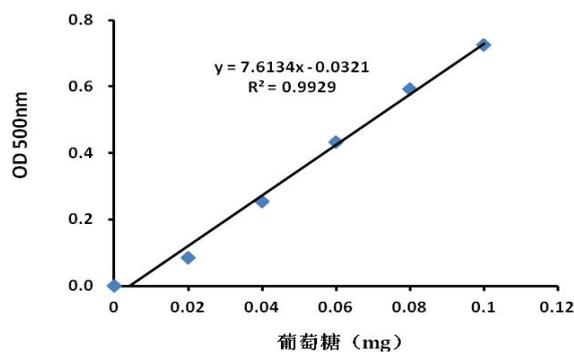
试剂（ μ L）	测定管	空白管（仅做一次）
样本	100	
蒸馏水		100
试剂三	100	100

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, 取 200 μ L 于 96 孔板中, 500nm 读取吸光值 A, $\Delta A = A - \text{测定-A 空白}$ 。		

【注】: 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。

五、结果计算:

1、标准曲线方程为 $y = 7.6134x - 0.0321$; x 为标准品质量 (mg), y 为 ΔA 。



2、按样本鲜重计算:

$$\begin{aligned} \text{总糖(mg/g 重量)} &= [(\Delta A + 0.0321) \div 7.6134] \div (W \times V1 \div V) \times D \\ &= 2.63 \times (\Delta A + 0.0321) \div W \times D \end{aligned}$$

3、按液体体积计算:

$$\begin{aligned} \text{总糖(mg/mL)} &= [(\Delta A + 0.0321) \div 7.6134] \div [V2 \times V1 \div V] \times D \\ &= 26.3 \times (\Delta A + 0.0321) \times D \end{aligned}$$

V---样品提取液总体积, 2mL; V1---测定时所取样品提取液的体积, 0.1mL;

V2---液体样品量, 0.1mL; 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 制备标准品母液 (1mg/mL): 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)。
- 2 把母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品: 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1. mg/mL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 依据测定管的加样表操作, 根据结果即可制作标准曲线。