

## 还原糖含量试剂盒说明书

(货号: G0502W 微板法 96 样)

### 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 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、乙醇、蒸馏水。

### 四、还原糖含量检测:

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 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 500nm。

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:

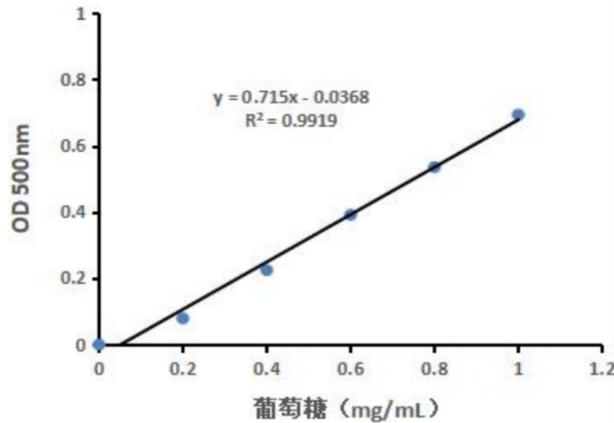
试剂 (μL)	测定管	空白管 (仅做一次)
样本	100	
蒸馏水		100
试剂一	100	100
混匀, 在 95°C水浴中加热 10min (盖紧封口, 防止水分散失), 取出后立即过冷水冷却至室温。		
蒸馏水	1000	1000
混匀, 取 200μL 于 96 孔板中, 500nm 读取吸光值 A, $\Delta A = A \text{ 测定} - A \text{ 空白}$ 。		

【注】: 1.若 $\Delta A$  值大于 1, 样本可用蒸馏水稀释后再测定, 稀释倍数  $D$  代入计算公式计算。

2.若 $\Delta A$  值小于 0.01, 则可加大样本加样体积  $V_1$  (如由  $100\mu\text{L}$  增至  $200\mu\text{L}$ , 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  $y = 0.715x - 0.0368$ ;  $x$  为标准品浓度 (mg/mL),  $y$  为吸光值  $\Delta A$ 。



2、按样本重量计算:

$$\text{还原糖}(\text{mg/g 重量}) = [(\Delta A + 0.0368) \div 0.715 \times V_1] \div (W \times V_1 \div V) \times D = 2.1 \times (\Delta A + 0.0368) \div W \times D$$

3、按质量分数 (%) 计算:

$$\begin{aligned} \text{还原糖}(\% \text{重量}) &= [(\Delta A + 0.0368) \div 0.715 \times V_1] \div (W \times V_1 \div V) \times 10^{-3} \times 100\% \\ &= [0.21 \times (\Delta A + 0.0368) \div W \times D]\% \end{aligned}$$

4、按液体体积计算:

$$\text{还原糖}(\text{mg/mL}) = (\Delta A + 0.0368) \div 0.715 \times D = 1.4 \times (\Delta A + 0.0368) \times D$$

$V$ ---样品提取液总体积, 1.5mL;       $V_1$ ---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。

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  $-20^\circ\text{C}$  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。