

总糖含量试剂盒说明书

微量法 100 管/96 样

正式测定前请选择 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义：

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。

测定原理：

总糖酸水解为还原糖，在 NaOH 和丙三醇存在下，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，在 540nm 处有最大吸收峰，以此测定样品中的总糖含量。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计/酶标仪、沸水浴、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔板、研钵、蒸馏水。

试剂的组成和配制：

试剂一：液体 100mL×1 瓶，4℃保存；

试剂二：液体 100mL×1 瓶，4℃保存；

试剂三：液体 5mL×1 瓶，4℃避光保存；

样品中总糖的提取：

组织：称取约 0.1g 样品，加入 1mL 试剂一，1.5mL 蒸馏水，匀浆，95℃水浴中加热 30min，加入 1mL 试剂二，混匀，用蒸馏水定容至 10mL，8000g 25℃离心 10min，取上清液待测。（注意稀释，见注意事项）

液体样本：取 0.1mL 样本，加入 1mL 试剂一，1.5mL 蒸馏水，匀浆，95℃水浴中加热 30min，加入 1mL 试剂二，8000g 25℃离心 10min，取上清液待测。（注意稀释，见注意事项）

测定步骤：

1、分光光度计或酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 540nm，蒸馏水调零。

2、调节水浴锅至 95 度。

3、在 EP 管中加入下列试剂：

试剂 (μL)	空白管	测定管
样本		12
蒸馏水	24	12
试剂三	18	18

混匀，置 95 度水浴中 10min（盖紧，以防止水分散失），冷却至室温

蒸馏水	258	258
-----	-----	-----

混匀，取 200μL 反应液至 96 孔酶标板中于 540nm 测定吸光值， $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{空白管}}$

注意：1、空白管只要做一管。

2、如果 ΔA 大于 2，需要将上清液用蒸馏水稀释，计算公式中乘以相应稀释倍数。

总糖含量计算：

1、标准条件下测定的回归方程为 $y = 0.3002x - 0.0507$ ；x 为标准品浓度 (mg/mL)，y 为吸光值。

2、按样本鲜重计算：

总糖 (mg / g 鲜重) = $[(\Delta A + 0.0507) \div 0.3002 \times V1] \div (W \times V1 \div V2) \times \text{稀释倍数} = 33.311 \times (\Delta A + 0.0507) \div W \times \text{稀释倍数}$ 。

3、按样本蛋白浓度计算:

总糖 (mg /mg prot) = $[(\Delta A + 0.0507) \div 0.3002 \times V1] \div (V1 \times Cpr) \times \text{稀释倍数}$ = $3.3311 \times (\Delta A + 0.0507) \div Cpr \times \text{稀释倍数}$ 。

4、按照液体体积计算:

总糖 (mg /mL) = $[(\Delta A + 0.0507) \div 0.3002 \times V1] \div [V3 \times V1 \div (V2 + V3)] \times \text{稀释倍数}$ = $119.9 \times (\Delta A + 0.0507) \times \text{稀释倍数}$ 。

V1: 加入样本体积, 0.012mL; V2: 加入提取液体积, 10mL/3.5mL; V3: 液体样本, 0.1mL;

Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本鲜重, g。

注意: 最低检测限为 1mg/g 鲜重或 10ng/mg prot