

还原糖含量试剂盒说明书

(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℃保存	
标准品	粉体 mg×1 支	4℃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℃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℃。

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。

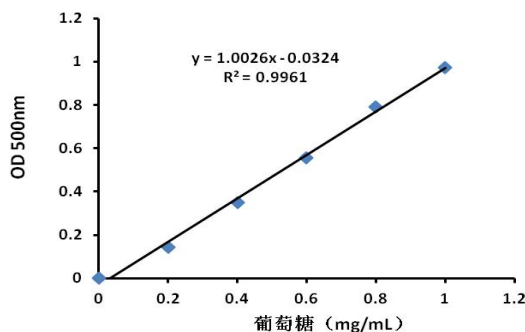
④ 在 EP 管中加入下列试剂：

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℃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 200 μL 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 ΔA 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 ΔA 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 $y = 1.0026x - 0.0324$; x 为标准品浓度 (mg/mL), y 为吸光值 ΔA 。



2、按样本重量计算:

$$\text{还原糖}(\text{mg/g 重量}) = [(\Delta A + 0.0324) \div 1.0026 \times V_1] \div (W \times V_1 \div V) \times D = 1.496 \times (\Delta A + 0.0324) \div W \times D$$

3、按质量分数 (%) 计算:

$$\begin{aligned} \text{还原糖}(\% \text{重量}) &= [(\Delta A + 0.0324) \div 1.0026 \times V_1] \div (W \times V_1 \div V) \times 10^{-3} \times 100\% \\ &= [0.1496 \times (\Delta A + 0.0324) \div W \times D]\% \end{aligned}$$

4、按液体体积计算:

$$\text{还原糖}(\text{mg/mL}) = (\Delta A + 0.0324) \div 1.0026 \times D = 0.997 \times (\Delta A + 0.0324) \times D$$

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°C 保存)。
- 2 把母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品: $0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1. \text{mg/mL}$ 。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。