

## 可溶性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。糖类在浓硫酸作用下经脱水反应生成糠醛或羟甲基糖醛，生成的糠醛或羟甲基糖醛与蒽酮脱水缩合，形成糠醛的衍生物，呈蓝绿色物质，其在可见光区 620nm 波长处有最大吸收，且其光吸收值在一定范围内与糖的含量成正比关系。该方法用于可溶性单糖、寡糖和多糖的含量测定，具有灵敏度高、简便快捷、适用于微量样品的测定等优点。

该方法的特点是几乎可以测定所有的糖类（包括单糖：戊糖、己糖、蔗糖、糖原、多缩葡萄糖等），所以用该方法测出的糖类含量是溶液中全部可溶性糖类含量。

### 二、试剂盒组分与配制：

试剂名称	规格	保存要求	备注
试剂一	粉剂×2 支	4℃避光保存	
试剂二	液体 5mL×1 瓶	4℃保存	
标准品	粉剂×1 支	4℃保存	若重新做标曲，则用到该试剂。

工作液配制：吸取 2mL 试剂二加入到一支试剂一中，混匀并充分溶解，即得工作液。

（如难溶解，可超声溶解或者 60℃水浴溶解；剩余试剂 4℃保存一周）。

### 三、所需的仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、水浴锅、可调式移液器、乙醇、浓硫酸（不允许快递）、研钵。

### 四、可溶性糖含量的测定：

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！

建议：选取样本做几个梯度的稀释，选取适合本次实验的稀释倍数 D。

#### 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 细菌/细胞样本：先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；取约 500 万细菌或细胞至 EP 管中，加入 1.5mL 的 80%乙醇（自备：取 80mL 乙醇溶于 20mL 蒸馏水中）超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；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，可按照细菌/细胞数量（ $10^4$ ）：提取液（mL）为 500~1000：1 的比例进行提取。

#### ③ 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 620nm。

- ② 调节水浴锅至 95-100°C，工作液用前需完全溶解。
- ③ 提示：大多数样本可溶性糖含量较高，为使 $\Delta A$  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。  
(强调：严禁稀释加热反应后的混合液，否则会出现浑浊现象)。
- ④ 在 EP 管中依次加入：

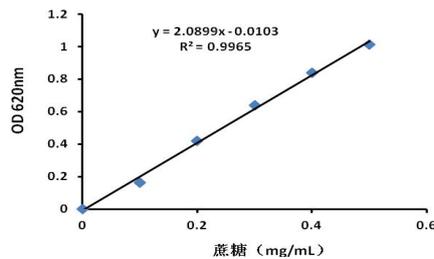
试剂 ( $\mu\text{L}$ )	测定管	空白管 (仅做一次)
样本	25	0
蒸馏水	75	100
工作液	30	30
浓硫酸(缓慢加入)	250	250

混匀后，放入 95-100°C 水浴中 10min (封口膜缠紧，防止水分散失)，冷却至室温后，取 200 $\mu\text{L}$  转移至 96 孔板中，于 620nm 读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{空白管}}$ 。

【注】 若 $\Delta A$  的值接近零，可增加样本加样体积 V1 (如由 25 $\mu\text{L}$  增至 50 $\mu\text{L}$ ，则蒸馏水相应减少)，则改变后的 V1 代入公式重新计算。

## 五、结果计算：

1、标准方程为  $y = 2.0899x - 0.0103$ ；x 为标准品浓度 (mg/mL)，y 为吸光值 $\Delta A$ 。



2、按样本重量计算：

$$\begin{aligned} \text{可溶性糖}(\text{mg/g 重量}) &= [(\Delta A + 0.0103) \div 2.0899 \times V1] \div (W \times V1 \div V) \times D \\ &= 0.718 \times (\Delta A + 0.0103) \div W \times D \end{aligned}$$

3、按质量分数 (%) 计算：

$$\begin{aligned} \text{可溶性糖}(\% \text{重量}) &= [(\Delta A + 0.0103) \div 2.0899 \times V1] \div (W \times V1 \div V) \times 10^{-3} \times 100\% \\ &= [0.0718 \times (\Delta A + 0.0103) \div W \times D] \% \end{aligned}$$

4、按细菌/细胞数量计算：

$$\begin{aligned} \text{可溶性糖}(\text{mg}/10^4 \text{cell}) &= [(\Delta A + 0.0103) \div 2.0899 \times V1] \div (500 \times V1 \div V) \times D \\ &= 0.00144 \times (\Delta A + 0.0103) \times D \end{aligned}$$

5、按液体体积计算：

$$\text{可溶性糖}(\text{mg/mL}) = (\Delta A + 0.0103) \div 2.0899 \times D = 0.479 \times (\Delta A + 0.0103) \times D$$

V---样品提取液总体积，1.5mL； V1---测定时所取样本的体积，0.025mL；

W---样本质量，g； 500---细胞数量，万；

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 的标准品 (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, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5. mg/mL。
- 3 依据测定管的加样表操作，根据结果即可制作标准曲线。