

## 多糖含量试剂盒说明书

(微板法 96 样)

### 一、产品简介：

糖在浓硫酸作用下，水解生成单糖，并迅速脱水生成糖醛衍生物，然后与苯酚缩合成橙黄色化合物，且颜色稳定，在波长 488 nm 处和一定的浓度范围内，其吸光度与多糖含量呈线性关系正比，再利用标准曲线定量算出样品中的多糖含量。

### 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×3 支	4℃保存	临用前甩几下使试剂落入底部，每支分别加 1.9mL 水溶解备用。
标准品	粉剂×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/金属浴、可调式移液器、乙醇、浓硫酸（不允许快递）、研钵。

### 四、多糖含量的测定：

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 多糖待检液制备：

##### a.组织样本：

- ① 若是烘干且研磨过 40 目筛后的样本，称取 3mg 过筛后细末至 2mLEP 管中，加入 2mL 蒸馏水；（若是鲜样则可取 0.1g 或 0.5g（水份足的样本）至 2mLEP 管中，加入 2mL 蒸馏水），于沸水浴（95-100℃）加热 2 小时（若放在金属浴上面可用重物压盖防止 EP 管崩开；间隔 20min 带防护手套轻轻晃动混匀几下），加热结束后取出放置至室温（中间过程液体若挥发严重，最后可用蒸馏水定容到 2mL），最后于 8000rpm 室温离心 5min，上清液待用。
- ② 取 0.2mL 上步离心后的上清液至新 EP 管中，再加入 1mL 乙醇混匀，于 4℃放置 1 小时，取出后 8000rpm 离心 5min 后弃上清，留沉淀；
- ③ 上步所得沉淀中再加入 1mL80%乙醇混匀几下（自备：取 80mL 乙醇溶于 20mL 蒸馏水中），8000rpm 离心 5min 后弃上清，留沉淀（可采用使 EP 管轻轻倒置于吸水纸上约 5min 吸干剩余上清液，尽量**避免沉淀损失**）；
- ④ 向上步所得沉淀中加入 2mL 蒸馏水，于沸水浴（95-100℃）加热直到沉淀全部溶解（约 5min）即多糖待检液。

##### b.液体样本：

- ① 取 0.2mL 液体(可先做两个样本预测定，确定适合本批液体样本取样量 V2)，至新 EP 管中，再加入 1mL 乙醇混匀（使乙醇在整个液体中占比至少 80%），于 4℃放置 1 小时，取出后 8000rpm 离心 5min 后弃上清，留沉淀；
- ② 上步所得沉淀中再加入 1mL80%乙醇混匀几下（自备：取 80mL 乙醇溶于 20mL 蒸馏水中），8000rpm 离心 5min 后弃上清，留沉淀（可采用使 EP 管轻轻倒置于吸水纸上约 5min 吸干剩余上清液，尽量**避免沉淀损失**）；
- ③ 向上步所得沉淀中加入 2mL 蒸馏水，于沸水浴（95-100℃）加热直到沉淀全部溶解（约 5min）即多糖待检液。

## 2、上机检测：

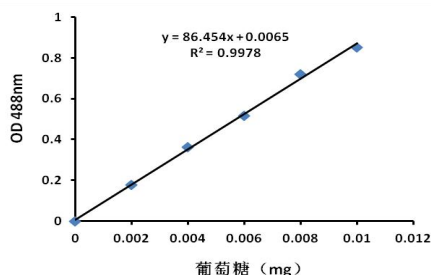
- ① 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 488nm，调节水浴锅或金属浴至 95-100℃。
- ② 在 EP 管中依次加入：

试剂 (μL)	测定管	空白管 (仅做一次)
多糖待检液	100	
蒸馏水		100
试剂一	50	50
浓硫酸(务必缓慢加入)	250	250
混匀后，放入 95℃水浴 20min（封口膜缠紧，防止水分散失），冷却至室温后，取 200μL 转移至 96 孔板中，于 488nm 读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{空白管}}$ 。		

- 【注】**：1. 如果  $\Delta A$  大于 1，需要将多糖待检液用蒸馏水稀释，计算公式中乘以相应稀释倍数 D。  
2. 若  $\Delta A$  值在零附近即低于 0.005，则可增加样本取样质量 W，则改变后的 W 需代入公式重新计算。

## 五、结果计算：

- 1、标准方程为  $y = 86.454x + 0.0065$ ；x 为标准品质量 (mg)，y 为吸光值  $\Delta A$ 。



- 2、按样本重量计算：

$$\begin{aligned} \text{多糖}(\text{mg/g 重量}) &= [(\Delta A - 0.0065) \div 86.454] \div (W \times V1 \div V) \times 10 \times D \\ &= 2.313 \times (\Delta A - 0.0065) \div W \times D \end{aligned}$$

- 3、按质量分数 (%) 计算：

$$\begin{aligned} \text{多糖}(\% \text{重量}) &= [(\Delta A - 0.0065) \div 86.454] \div (W \times V1 \div V) \times 10 \times D \times 10^{-3} \times 100\% \\ &= [0.2313 \times (\Delta A - 0.0065) \div W \times D]\% \end{aligned}$$

- 4、按液体体积计算：

$$\begin{aligned} \text{多糖}(\text{mg/mL 液体}) &= [(\Delta A - 0.0065) \div 86.454] \div (V2 \times V1 \div V) \times D \\ &= 0.2313 \times (\Delta A - 0.0065) \div V2 \times D \end{aligned}$$

V---样品提取液总体积，2mL；

V1---测定时待检液体积，0.1mL；

V2---液体取样体积，mL；

10---②步中取 0.2mL 处理后变成 2mL 体积；

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℃ 保存）。
- 2 把母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品：0, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1. 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。