

还原糖含量试剂盒说明书

微量法 100管/48样

正式测定前务必取2-3个预期差异较大的样本做预测定

测定意义：

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，其中葡萄糖和果糖不仅是呼吸作用的主要底物，也是进一步合成蔗糖、淀粉和纤维素的底物。

测定原理：

加热促进碱性溶液中3,5-二硝基水杨酸溶液与还原糖生成棕红色氨基化合物，在540nm有特征吸收峰；在一定的浓度范围内，还原糖含量与540nm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。

自备仪器和样品：

可见分光光度计/酶标仪、水浴锅、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：

试剂一：100mL×1瓶，4℃保存；

试剂二：8mL×1瓶，4℃保存；

样品中还原糖的提取：

1、细菌或细胞的处理：收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；按照细菌或细胞数量（ 10^4 个）：试剂一体积（mL）为500~1000：1的比例（建议500万细菌或细胞加入1mL试剂一），超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率20%或200W，超声3S，间隔10S，重复30次），转移到有盖离心管中（防止加热时水分散失），80℃水浴中40min并且振荡8~10次，8000g，25℃离心10min，取上清供测定用。

2、组织的处理：按照组织质量（g）：试剂一体积（mL）为1：5~10的比例（建议称取约0.1g组织，加入1mL试剂一），冰浴匀浆，转移到有盖离心管中（防止加热时水分散失），80℃水浴中40min并且振荡8~10次，8000g，25℃离心10min，取上清供测定用。

3、血清（浆）的处理：按照血清（浆）体积（mL）：试剂一体积（mL）为1：5~10的比例（建议取0.1mL血清（浆）加入1mL试剂一），冰浴匀浆，转移到有盖离心管中（防止加热时水分散失），80℃水浴中40min并且振荡8~10次，8000g，25℃离心10min，取上清供测定用。

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℃。

3、在EP管中加入下列试剂：

试剂（ μ L）	对照管	测定管
样本	175	175
试剂二		125
蒸馏水	125	

混匀，在95℃水浴中加热5min（盖紧，防止水分散失），取出后立即冷却至室温，混匀。取200 μ L至微量石英比色皿或96孔板中，540nm波

长下读取对照管和测定管吸光值。计算 $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ 。每个测定管需设一个对照管。

注意：如果 ΔA 大于2，需要将样本用试剂一稀释，计算公式中乘以相应稀释倍数（若显色后出现分层现象，可改用蒸馏水稀释）。

还原糖含量试剂盒说明书还原糖含量计算：

a.用微量石英比色皿测定的计算公式如下

1、标准条件下测定回归方程为 $y = 8.3796x - 0.3034$ ；x为标准品浓度（mg/mL），y为吸光值。

2、按样本鲜重计算：

$$\text{还原糖}(\mu\text{g/g鲜重}) = [1000 \times (\Delta A + 0.3034) \div 8.3796 \times V1] \div (W \times V1 \div V2) = 119.34 \times (\Delta A + 0.3034) \div W$$

3、按样本蛋白浓度计算：

$$\text{还原糖}(\mu\text{g/mg prot}) = [1000 \times (\Delta A + 0.3034) \div 8.3796 \times V1] \div (V1 \times Cpr) = 119.34 \times (\Delta A + 0.3034) \div Cpr$$

4、按细菌或细胞密度计算：

$$\text{还原糖}(\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) = [1000 \times (\Delta A + 0.3034) \div 8.3796 \times V1] \div (500 \times V1 \div V2) = 0.239 \times (\Delta A + 0.3034)$$

5、按血清（浆）体积计算：

$$\text{还原糖}(\mu\text{g/mL}) = [1000 \times (\Delta A + 0.3034) \div 8.3796 \times V1] \div (V3 \times V1 \div V2) = 1193.4 \times (\Delta A + 0.3034)$$

1000：1mg/mL=1000 μ g/mL；V1：加入样本体积，0.175mL；V2：加入试剂一体积，1 mL；V3：加入血清（浆体积），0.1mL；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；500：细菌或细胞总数，500万。

b.用96孔板测定的计算公式如下

1、标准条件下测定回归方程为 $y = 4.1898x - 0.3034$ ， $R^2 = 0.9997$ ；x为标准品浓度（mg/mL），y为吸光值。

2、按样本鲜重计算：

$$\text{还原糖}(\mu\text{g/g鲜重}) = [1000 \times (\Delta A + 0.3034) \div 4.1898 \times V1] \div (W \times V1 \div V2) = 238.67 \times (\Delta A + 0.3034) \div W$$

3、按样本蛋白浓度计算：

$$\text{还原糖}(\mu\text{g/mg prot}) = [1000 \times (\Delta A + 0.3034) \div 4.1898 \times V1] \div (V1 \times Cpr) = 238.67 \times (\Delta A + 0.3034) \div Cpr$$

4、按细菌或细胞密度计算：

$$\text{还原糖}(\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) = [1000 \times (\Delta A + 0.3034) \div 4.1898 \times V1] \div (500 \times V1 \div V2) = 0.477 \times (\Delta A + 0.3034)$$

5、按血清（浆）体积计算：

$$\text{还原糖}(\mu\text{g/mL}) = [1000 \times (\Delta A + 0.3034) \div 4.1898 \times V1] \div (V3 \times V1 \div V2) = 2386.7 \times (\Delta A + 0.3034)$$

1000：1mg/mL=1000 μ g/mL；V1：加入样本体积，0.175mL；V2：加入试剂一体积，1 mL；V3：加入血清（浆体积），0.1mL；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；500：细菌或细胞总数，500万。

注意：最低检测限为1mg/g鲜重或10 μ g/mg prot