

还原糖含量试剂盒说明书

微量法 100 管/48 样

注 意：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。

需自备的仪器和用品：

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 吧，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 μL 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：

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

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=1000μg/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：

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

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=1000μg/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 10μg/mg prot