

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。

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 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：

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：

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：

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：

还原糖($\mu\text{g/mL}$)=[$1000 \times (\Delta A + 0.3034) \div 8.3796 \times V1$] \div [$V3 \times V1 \div (V2 + V3)$]= $1312.7 \times (\Delta A + 0.3034)$

1000: 1mg/mL=1000 $\mu\text{g/mL}$ ；V1: 加入样本体积, 0.175mL；V2: 加入提前液体积, 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：

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：

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：

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：

还原糖 ($\mu\text{g/mL}$) = [$1000 \times (\Delta A + 0.3034) \div 4.1898 \times V1$] \div [$V3 \times V1 \div (V2 + V3)$] = $2625.4 \times (\Delta A + 0.3034)$

1000: 1mg/mL=1000 $\mu\text{g/mL}$ ；V1: 加入样本体积, 0.175mL；V2: 加入提取液体积, 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 $\mu\text{g/mg prot}$