

### 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<sup>4</sup>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（ $\mu\text{L}$ ）	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 $\mu\text{L}$ 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 $\Delta A$ 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( $\mu\text{g}/104 \text{ cell}$ )=[ $1000 \times (\Delta A + 0.3034) \div 8.3796 \times V1$ ] $\div$ ( $500 \times V1 \div V2$ )= $0.239 \times (\Delta A + 0.3034)$

5、按血清（浆）体积计算：

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

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：

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 ( $\mu\text{g}/104 \text{ cell}$ ) = [ $1000 \times (\Delta A + 0.3034) \div 4.1898 \times V1$ ] $\div$ ( $500 \times V1 \div V2$ )= $0.477 \times (\Delta A + 0.3034)$

5、按血清（浆）体积计算：

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

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 $\mu\text{g/mg prot}$