

上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0425

Size: 100T/48S

还原糖含量检测试剂盒说明书

微量法

***正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定**

一、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。

二、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。

三、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、微量玻璃比色皿/96 孔板、研钵、蒸馏水。

四、试剂的组成和配置：

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
试剂一	液体 100mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	液体 20mL×1 瓶	4℃保存	
标准品	粉剂×1 支	4℃保存	含 10mg 无水葡萄糖（干燥失重<0.2%），临用前加入 1mL 蒸馏水溶解备用，4℃可保存 1 周，或者用饱和苯甲酸溶液溶解，可保存更长时间
标准品准备：将标准品用蒸馏水稀释至 0.3、0.25、0.2、0.15、0.1、0.05mg/mL。			

五、操作步骤：

● 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 0.9mL 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。

● 测定操作表：

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. 在EP 管中加入下列试剂：

试剂 (μL)	对照管	测定管	标准管	空白管
样本	175	175	—	—
标准液	—	—	175	
试剂二	—	125	125	125
蒸馏水	125	—	—	175

混均匀，在沸水浴中加热 5min（盖紧，防止水分散失），取出后立即冷却至室温，混匀。取 200 μL 至微量玻璃比色皿或 96 孔板中，540nm 波长下读取标准管、对照管、测定管和空白管吸光值。计算 $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ 。

根据标准管的浓度和吸光度（ $A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}$ ）建立标准曲线，x 为吸光值，y 为标准品浓度（mg/mL）。

注意：

- (1) 每个测定管需设定一个对照管。
- (2) 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的稀释倍数。

六、还原糖含量计算：

1、根据标准曲线计算样品中还原糖的含量，即将 ΔA （ $A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ ）带入 x 计算出 y 值。

2、按样本鲜重计算：

$$\text{还原糖} (\mu\text{g/g 鲜重}) = 1000 \times y \times V1 \div W = 1000 \times y \div W$$

3、按样本蛋白浓度计算：

$$\text{还原糖} (\mu\text{g/mg prot}) = (1000 \times y \times V1) \div (V1 \times C_{\text{pr}}) = 1000 \times y \div C_{\text{pr}}$$

4、按细菌或细胞数量计算：

还原糖 ($\mu\text{g} / 10^4 \text{ cell}$) = $1000 \times y \times V1 \div 500 = 2 \times y$

5、按血清（浆）体积计算：

还原糖 ($\mu\text{g/mL}$) = $1000 \times y \times V2 \div V3 = 10000 \times y$

1000：单位换算系数， $1\text{mg/mL} = 1000 \mu\text{g/mL}$ ；V1：加入试剂一体积，1mL；V2：加入血清和试剂一总体积，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 0.5mg/g 鲜重或 $10 \mu\text{g/mg prot}$