

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-S0703

Size: 50T/24S

还原糖含量检测试剂盒说明书

可见分光光度法

*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、水浴锅、可调式移液器、1mL 玻璃比色皿、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°C 保存	
试剂二	液体 35mL × 1 瓶	4°C 保存	
标准品	粉剂 × 1 支	4°C 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°C 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：先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 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 1000 万细菌或细胞加入 2mL 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°C 水浴中 40min 并且振荡 8~10 次，8000g，常温离心 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 0.2g 组织加入 2mL 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°C 水浴中 40min 并且振荡 8~10 次，8000g，常温离心 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 (建议取约 0.2mL 血清 (浆) 加入 1.8mL 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°C 水浴中 40min 并且振荡 8~10 次，8000g，常温离心 10min，取上清供测定用。

● 测定操作表：

1. 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	700	700		
标准液			700	
试剂二		500	500	500
蒸馏水	500			700

将各管摇匀，在沸水浴加热 5min (盖紧，防止水分散失) 取出后立即冷却至室温，混匀。在 540nm 波长下，用蒸馏水调零，读取标准管、对照管、测定管和空白管吸光值。计算 $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ 。

根据标准管浓度和吸光度（为 A 标准-A 空白）建立标准曲线，x 为吸光度，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 测定管-A 对照管）带入 x 计算出 y 值。

2、按样本鲜重计算：

$$\text{还原糖}(\mu\text{g/g 鲜重})=1000 \times y \times V1 \div W=2000 \times y \div W$$

3、按样本蛋白浓度计算：

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

4、按细菌或细胞密度计算：

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

5、按血清（浆）体积计算：

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

1000：1mg/mL=1000 μ g/mL；V1：加入试剂一体积，2mL；V2：加入血清（浆）和试剂一总体积，2 mL；V3：加入血清（浆）体积，0.2mL；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；500：细菌或细胞密度，500 万/mL。