

还原糖含量检测试剂盒说明书

微量法

货号：AC10112

规格：100T/48S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系本公司工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
试剂一	液体 100 mL×1 瓶	4°C保存
试剂二	液体 20 mL×1 瓶	4°C保存
标准品	粉剂×1 支	4°C保存

溶液的配制：

标准品：含 10 mg 无水葡萄糖（干燥失重<0.2%），临用前加入 1 mL 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。

产品说明：

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。

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，即可求出样本中还原糖的量。

技术指标：

最低检出限：0.0616 mg/mL

线性范围：0.1-0.6 mg/mL

注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

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/匀浆器、蒸馏水。

操作步骤：**一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）**

- 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°C水浴中 40min 并且振荡 8~10 次，8000g，25°C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°C水浴中 40min 并且振荡 8~10 次，8000g，25°C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。

二、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. 标准品准备：将标准品用蒸馏水稀释至 0.6、0.5、0.4、0.3、0.2、0.1 mg/mL。
3. 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 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ 。

三、还原糖含量计算

1、标准曲线的建立：

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

2、按样本质量计算：

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

3、按样本蛋白浓度计算：

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

4、按细菌或细胞数量计算：

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

5、按血清（浆）体积计算：

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

1000：单位换算系数，1mg/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，1mL；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。

注意事项：

1. 每个测定管需设定一个对照管。
2. 如果测定吸光值超过线性范围吸光值，可以增加样本量或者稀释样本后再进行测定。

参考文献：

[1] Lindsay H. A colorimetric estimation of reducing sugars in potatoes with 3, 5-dinitrosalicylic acid[J]. Potato Research, 1973, 16(3): 176-179.

[2] Breuil C, Saddler J N. Comparison of the 3, 5-dinitrosalicylic acid and Nelson-Somogyi methods of assaying for reducing sugars and determining cellulase activity[J]. *Enzyme and microbial technology*, 1985, 7(7): 327-332.

[3] Brunton N P, Gormley T R, Murray B. Use of the alditol acetate derivatisation for the analysis of reducing sugars in potato tubers[J]. *Food chemistry*, 2007, 104(1): 398-402.