

还原糖(RS)含量检测试剂盒说明书

Reducing Sugar Assay Kit

微量法

货号: AK101

规格: 100T/48S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
AK101-A	100ml×1 瓶	4℃保存
AK101-B	20ml×1 瓶	4℃保存
AK101-标准品	粉剂×1 支	4℃保存

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介:

意义: 还原糖 (Reducing Sugar, RS) 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。

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。

自备用品:

可见分光光度计/酶标仪、微量玻璃比色皿/96 孔板、水浴锅、可调式移液枪、研钵、冰和双蒸水。

样品中还原糖的提取:

1. 细菌或培养细胞: 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): AK101-A (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 1000 万细菌或细胞加入 2mL AK101-A, 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, 常温离心 10min, 取上清供测定用。
2. 组织: 按照组织质量 (g): AK101-A 体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.2g 组织, 加入 2mL AK101-A), 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, 常温离心 10min, 取上清供测定用。
3. 血清 (浆) 样品: 按照血清 (浆) 体积 (mL): AK101-A 体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例 (建议取 0.2mL 血清 (浆) 加入 1.8mL AK101-A), 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/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: 临用前加入 1 mL 蒸馏水溶解成 10mg/ml 的标准品原液备用 (4℃可保存 1 周), 再将标准品用蒸馏水稀释至 0.25、0.2、0.15、0.1、0.05 mg/mL。
3. 在 EP 管中加入下列试剂:

试剂名称	对照管(ul)	测定管 (ul)	标准管(ul)	空白管(ul)
样本	175	175		
标准液			175	
AK101-B		125	125	125
蒸馏水	125			175

将各管摇匀，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；在 540nm 波长下读取各管吸光值。计算 $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ 。

注意事项：

1. 每个测定管需设一个对照管。
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。

还原糖含量计算：

1. 绘制标准条件：

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

2. 计算公式：

(1) 按样本鲜重计算：

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

(2) 按样本蛋白浓度计算：

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

(3) 按细菌或细胞密度计算：

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

(4) 按血清（浆）体积计算：

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

注：1000: 1mg/mL=1000 $\mu\text{g/mL}$ ；V1: 加入 AK101-A 体积，2mL；V2: 加入血清（浆）和 AK101-A 总体积，2mL；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；1000: 细菌或细胞数量，1000 万。