

还原糖含量检测试剂盒说明书

产品货号	产品名称	包装规格	测定方法
PYHC4-M48	还原糖含量检测试剂盒	48T	微量法
PYHC4-M96		96T	

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，即可求出样本中还原糖的量。

三、试剂组成

试剂名称	试剂装量 (48T)	试剂装量 (96T)	保存条件
提取液	液体 50 mL×1 瓶	液体 100 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 20 mL×1 瓶	液体 40 mL×1 瓶	2-8℃保存
标准品 (10 mg 葡萄糖)	粉剂 ×1 瓶	粉剂 ×1 瓶	2-8℃保存
	临用前加入 1 mL 蒸馏水混匀溶解，配制成 10 mg/mL 标准液备用，4℃可保存 2 周。		

四、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）

取一定量植物组织擦净水分及杂质，剪碎后放入研钵，加入液氮，研磨成粉状后转移出来，然后准确称重，按照组织质量 (g)：提取液体积 (mL) 为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液），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、酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 540nm，蒸馏水调零；
- 2、不同浓度标准液配制：将 10 mg/mL 标准液用蒸馏水稀释至 0.25、0.2、0.18、0.16、0.14、0.12、0.1 、0.08mg/mL。
- 3、操作表（在 EP 管中依次加入下列试剂）：

试剂名称	测定管	对照管	标准管	空白管
上清液 (μL)	175	175	-	-
标准液 (μL)	-	-	175	-
试剂一 (μL)	125	-	125	125
蒸馏水 (μL)	-	125	-	175
充分混匀，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。取 200μL 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 $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$ 。空白管和标准曲线只需做 1-2 次。				

五、还原糖含量的计算：

1、标准曲线的建立：根据标准管的浓度(y, mg/mL)和吸光度 $\Delta A_{\text{标准}}$ (x, $\Delta A_{\text{标准}}$)，建立标准曲线。根据标准曲线，将 $\Delta A_{\text{测定}}$ (x, $\Delta A_{\text{测定}}$) 带入公式计算样本浓度(y, mg/mL)。

2、按样本质量计算：

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

3、按样本蛋白浓度计算：

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

1000：单位换算系数，1mg/mL=1000μg/mL；V：加入提取液体积，1mL；0.1mL；C_{pr}：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g。

六、注意事项：

如果测定吸光值超过线性范围吸光值，请将样品用提取液进行适当的稀释再测定，并在计算公式中乘以稀释倍数。