

## 海藻糖含量试剂盒说明书

分光光度法 50 管/48 样

**正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定**

### 测定意义:

海藻糖广泛存在于动物、植物、微生物和培养细胞中。由于海藻糖具有独特的不同于其他碳水化合物的生物学特性，能在干旱、高温、脱水、冷冻、高渗透压及毒性物质等恶劣环境下保护生物体细胞蛋白质、脂肪、糖类、核酸等组分不受损害。

### 测定原理:

蒽酮比色法。具有灵敏度高、简便快捷、适用于微量样品的测定等优点。

### 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、浓硫酸（不允许快递）和蒸馏水。

### 试剂的组成和配制:

提取液：液体 50ml×1 瓶，4℃保存；

试剂一：粉剂×1 瓶，4℃保存；

### 海藻糖提取:

1、细菌或细胞处理：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)：提取液体积(mL)为 500~1000: 1 的比例(建议 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液)，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)，室温静置 45min，振荡 3~5 次，冷却后，8000g，25℃离心 10min，取上清。

2、组织的处理：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，室温静置 45min，振荡 3~5 次，冷却后，8000g，25℃离心 10min，取上清。

3、血清(浆)的处理：按照血清(浆)体积(mL)：提取液体积(mL)为 1: 5~10 的比例(建议取 0.1mL 血清(浆)加入 1mL 提取液)，冰浴匀浆，室温静置 45min，振荡 3~5 次，冷却后，8000g，25℃离心 10min，取上清。

**测定步骤:**

- 1、分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 620nm，蒸馏水调零。
- 2、调节水浴锅至 95 度。
- 3、工作液的配制：临用前在试剂一中加入 7.5mL 蒸馏水后，缓慢加入 42.5mL 浓硫酸，不断搅拌，充分溶解，待用；用不完的试剂 4℃ 保存一周；
- 4、样本测定 取 0.25mL 样本和 1mL 工作液至 EP 管中，95 度水浴 10 min（盖紧，防止水分散失），自然冷却至室温，在 620 nm 波长下记录测定吸光度值 A。

**注意:**

由于工作液具有强腐蚀性，请谨慎操作。  
若吸光值大于 1，请将样本用提取液稀释后再测定，计算公式中乘以相应的稀释倍数。

**海藻糖含量计算:**

1、标准条件下测定回归方程为  $y = 8.8976x + 0.0729$ ；x 为标准品浓度（mg/mL），y 为吸光值。

2、按样本鲜重计算:

海藻糖含量 (mg/g 鲜重) =  $[V1 \times (A - 0.0729) \div 8.8976] \div (W \times V1 \div V2) = 0.112 \times (A - 0.0729) \div W$ 。

3、按样本蛋白浓度计算:

海藻糖含量 (mg/mg prot) =  $[V1 \times (A - 0.0729) \div 8.8976] \div (V1 \times Cpr) = 0.112 \times (A - 0.0729) \div Cpr$ 。

4、按细菌或细胞密度计算:

海藻糖含量 ( $\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}$ ) =  $[1000 \times V1 \times (A - 0.0729) \div 8.8976] \div (500 \times V1 \div V2) = 0.224 \times (A - 0.0729)$

5、血清（浆）海藻糖含量计算

海藻糖含量 (mg/mL) =  $[V1 \times (A - 0.0729) \div 8.8976] \div (V3 \times V1 \div V2) = 1.12 \times (A - 0.0729)$

1000: 1mg/mL=1000 $\mu\text{g}$ /mL; V1: 加入反应体系中样本体积, 0.25 mL; V2: 加入提取液总体积 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: 最低检测限为 10 $\mu\text{g}$ /g 鲜重或 0.1 $\mu\text{g}$ / mg prot**