

海藻糖含量试剂盒说明书

微量法 100 管/96 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/酶标仪、水浴锅、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔板、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 100ml×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、分光光度计或酶标仪预热 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 3.75mL 蒸馏水后，缓慢加入 21.25mL 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 60 μL 样本和 240 μL 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，取 200μL 至微量石英比色皿或 96 孔板中，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:
a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

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(μg/10⁴ 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=1000μg/mL；V1: 加入反应体系中样本体积，60 μL=0.06mL；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: 样品质量，g；500: 细菌或细胞总数，500 万。

b. 用 96 孔板测定的计算公式如下

1、标准条件下测定回归方程为 $y = 4.4488x + 0.0729$ ；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) = $[V1 \times (A - 0.0729) \div 4.4488] \div (W \times V1 \div V2) = 0.224 \times (A - 0.0729) \div W$ 。

3、按样本蛋白浓度计算：

海藻糖含量(mg/mg prot) = $[V1 \times (A - 0.0729) \div 4.4488] \div (V1 \times Cpr) = 0.224 \times (A - 0.0729) \div Cpr$ 。

4、按细菌或细胞密度计算：

海藻糖含量(μg/10⁴cell) = $[1000 \times V1 \times (A - 0.0729) \div 4.4488] \div (500 \times V1 \div V2) = 0.448 \times (A - 0.0729)$

5、血清（浆）海藻糖含量计算

海藻糖含量(mg/mL)=[V1×(A -0.0729) ÷4.4488) ÷(V3×V1÷V2)=2.24×(A -0.0729)

1000: 1mg/mL=1000μg/mL; V1: 加入反应体系中样本体积, 60 μ L=0.06mL; 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 10μg/g 鲜重或 0.1μg/ mg prot



Lifemall.asia

To be with you