

海藻糖含量试剂盒

微量法 100 管/96 样

注 意：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（10⁴ 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 200uL 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×(A -0.0729)÷8.8976]÷(W×V1÷V2)=0.112×(A -0.0729) ÷W。

3、按样本蛋白浓度计算：

海藻糖含量(mg/mg prot)=[V1×(A -0.0729) ÷8.8976]÷(V1×Cpr)=0.112×(A -0.0729) ÷Cpr。

4、按细菌或细胞密度计算：

海藻糖含量(μ g/104 cell)=[1000 ×V1 ×(A -0.0729) ÷8.8976]÷(500 ×V1÷V2)=0.224 ×(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) ÷8.8976]÷(V3×V1÷V2)=1.12×(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×(A -0.0729)÷4.4488]÷(W×V1÷V2)=0.224×(A -0.0729) ÷W。

3、按样本蛋白浓度计算：

海藻糖含量(mg/mg prot)=[V1×(A -0.0729)÷4.4488]÷(V1×Cpr)=0.224×(A -0.0729) ÷Cpr。

4、按细菌或细胞密度计算：

海藻糖含量(μ g/104cell)=[1000×V1×(A-0.0729)÷4.4488]÷(500×V1÷V2)=0.448×(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 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: 样本质量, g; 500: 细菌或细胞总数, 500 万。

注意: 最低检测限为 10 μg/g 鲜重或 0.1 μg/ mg prot