

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 60μL 样本和 240μL 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($\mu\text{g}/10^4$ 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 μg /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。

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($\mu\text{g}/10^4$ cell) = $[1000 \times V1 \times (A - 0.0729) \div 4.4488] \div (500 \times V1 \div V2) = 0.448 \times (A - 0.0729)$

5、血清（浆）海藻糖含量计算

海藻糖含量(mg/mL) = $[V1 \times (A - 0.0729) \div 4.4488] \div (V3 \times V1 \div V2) = 2.24 \times (A - 0.0729)$

1000: 1mg/mL=1000 μg /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