

## 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（10<sup>4</sup> 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) =  $[V1 \times (A - 0.0729) \div 8.8976] \div (W \times V1 \div V2) = 0.112 \times (A - 0.0729) \div W$ 。

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) =  $[V1 \times (A - 0.0729) \div 8.8976] \div (V3 \times V1 \div V2) = 1.12 \times (A - 0.0729) \times 1000$  :  
1mg/mL=1000 $\mu\text{g}$ /mL; V1: 加入反应体系中样本体积, 60  $\mu\text{L}$ =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) =  $[V1 \times (A - 0.0729) \div 4.4488] \div (W \times V1 \div V2) = 0.224 \times (A - 0.0729) \div W$ 。

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( $\mu\text{g}/10^4\text{cell}$ )= $[1000 \times V1 \times (A - 0.0729) \div 4.4488] \div (500 \times V1 \div V2) = 0.448 \times (A - 0.0729)$  5、血清(浆)

海藻糖含量计算

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

1000:  $1\text{mg}/\text{mL} = 1000\mu\text{g}/\text{mL}$ ; V1: 加入反应体系中样本体积,  $60\mu\text{L} = 0.06\text{mL}$ ; V2: 加入提取液总体积  $1\text{mL}$ ; ;  
V3: 加入血清(浆)体积,  $0.1\text{mL}$ ; Cpr: 样本蛋白质浓度,  $\text{mg}/\text{mL}$ ; W: 样本质量,  $\text{g}$ ; 500: 细菌或细胞总数, 500 万。

注意: 最低检测限为  $10\mu\text{g}/\text{g}$  鲜重或  $0.1\mu\text{g}/\text{mg prot}$