

海藻糖含量试剂盒

分光光度法 50 管/48 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、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（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($\mu\text{g}/10^4$ 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, 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 $\mu\text{g}/\text{g}$ 鲜重或 0.1 $\mu\text{g}/\text{mg prot}$