

海藻糖含量检测试剂盒说明书

微量法

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。

货号: D100065

规格: 100T/96S

产品内容：

提取液：液体 100mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂一：粉剂×1 瓶，4℃ 保存；

标准品：粉剂×1 支，含 10mg 海藻糖。

产品说明：

海藻糖存在于大量有机体中，包括细菌、藻类、酵母、植物、昆虫和其他无脊椎动物。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。

测定方法采用蒽酮比色法。具有灵敏度高、简便快捷、适用于微量样品的测定等优点。

操作步骤：

一、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；按照每 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液，超声波破碎细菌或细胞（功率 20% 或 200w，超声 3 秒，间隔 10 秒，重复 30 次），室温静置 45min，振荡 3~5 次，冷却后，8000g，常温离心 10min，取上清。
- 2、组织的处理：称取约 0.1g 样本，加入 1mL 提取液，冰浴匀浆或研碎，室温静置 45min，振荡 3~5 次，冷却后，8000g，常温离心 10min，取上清。
- 3、血清（浆）的处理：吸取约 100 μ L 血清（浆），加入 0.9mL 提取液，充分混匀，室温静置 45min，振荡 3~5 次，冷却后，8000g，常温离心，取上清。
- 4、标准品的处理：标准品用 1mL 双蒸水溶解，溶液浓度为 10mg/mL，稀释到 0.1、0.08、0.06、0.04、0.02、0mg/mL。

二、测定操作表：

- 1、分光光度计或酶标仪预热 30min，波长调节至 620nm，蒸馏水调零。调节水浴锅至 95℃。
- 2、工作液的配制：临用前在每瓶试剂一中加入 7mL 蒸馏水后，缓慢加入 28mL 浓硫酸，不断搅拌，充分溶解，待用。用不完的试剂 4℃ 保存一周。
- 3、标准曲线的建立：取 60 μ L 标准液和 240 μ L 现配的工作液混匀，95℃ 水浴 10 min，（盖紧，防止水分散失）自然冷却至室温，取 200 μ L 至比色皿或酶标板中，在 620nm 处测吸光值 A。根据标准样本的浓度（y）和吸光度（x）建立标准曲线。
- 4、样本测定：取 60 μ L 样本和 240 μ L 现配的工作液混匀，95℃ 水浴 10 min，（盖紧，防止水分散失）自然冷却至室温，取 200 μ L 至比色皿或酶标板中，在 620 nm 波长下测定吸光度值为 A。若吸光值大于 1，请将样本用提取液适当稀释。最后计算时乘以相应的稀释倍数。

三、海藻糖含量计算：

使用微量比色皿时，计算公式如下：

1、根据标准曲线计算样本中海藻糖的含量 y (mg/mL)。

2、按样本鲜重计算：

$$\text{海藻糖含量(mg/g 鲜重)} = V1 \times y \div (W \times V1 \div V2) = y \div W。$$

3、按样本蛋白浓度计算：

$$\text{海藻糖含量(mg/mg prot)} = V1 \times y \div (V1 \times Cpr) = y \div Cpr。$$

4、按细菌或细胞数量计算：

$$\text{海藻糖含量}(\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) = 1000 \times V1 \times y \div (500 \times V1 \div V2) = 2 \times y$$

5、血清（浆）海藻糖含量计算

$$\text{海藻糖含量 (mg/mL)} = V1 \times y \div (V3 \times V1 \div V2) = 10 \times y$$

V1: 反应体系中样本体积，0.06mL； V2: 提取液总体积，1mL； V3: 血清、血浆体积，0.1mL； Cpr: 样本蛋白浓度，mg/mL； W: 样本质量，g； 500: 细胞或细菌总数，500万； 1000:单位换算系数，1mg/mL=1000 μ g/mL。

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