

## 海藻糖含量检测试剂盒说明书

产品货号	产品名称	包装规格	测定方法
AMHC7-M48	海藻糖含量检测试剂盒	48T	微量法
AMHC7-M96		96T	

### 一、测定意义：

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。

### 二、测定原理：

测定方法采用蒽酮比色法。具有灵敏度高、简便快捷、适用于微量样本的测定等优点。但是蒽酮比色法也存在一定缺陷，如果样本中含有可溶性糖，则会影响测定。本试剂盒建议用于除海藻糖外不含其他可溶性糖样本的测定。

### 三、试剂组成：

试剂名称	试剂装量(48T)	试剂装量(96T)	保存条件
提取液	液体 60 mL×1 瓶	液体 110 mL×1 瓶	2~8℃保存
试剂一	粉剂×1 瓶	粉剂×2 瓶	2~8℃保存
工作液的配制：临用前在 1 瓶试剂一粉剂中加入 15mL88%硫酸溶液（3mL 水中缓慢加入 12mL 浓硫酸），不断搅拌，充分溶解，待用。用不完的试剂 2-8℃保存一周，试剂颜色变深后则不可以再使用。			
标准品	粉剂×1 支	粉剂×1 支	2~8℃保存
	临用前加 1 mL 蒸馏水，溶液浓度为 10 mg/mL，2-8℃保存两周		

### 四、操作步骤：

#### 样本前处理

1、组织：取一定量植物组织擦净水分及杂质，剪碎后放入研钵，加入液氮，研磨成粉状后转移出来，然后准确称重，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），旋涡混匀抽提 3-5 分钟或者使用组织破碎仪冰浴提取，8000g，4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

2、细菌/细胞：按照细胞数量（ $10^4$  个）：提取液体积（mL）为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细胞加入 1mL 提取液），冰浴超声波破碎细胞（功率 200W，超声 3 秒，间隔 7 秒，总时间 5min）；然后 10000g，4℃离心 10min，取上清置于冰上待测。

3、血清（浆）的处理：吸取约 100 $\mu$ 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 10min，取上清。

## 测定步骤

- 1、酶标仪预热30min 以上，调节波长至620nm。
- 2、将10 mg/mL标准液用蒸馏水稀释至0.1、0.05、0.025、0.0125、0.00625、0.003125mg/mL备用。
- 3、操作表（在 EP 管中操作）：

试剂名称	测定管	标准管	空白管
样本（ $\mu\text{L}$ ）	50	-	-
标准液（ $\mu\text{L}$ ）	-	50	-
蒸馏水（ $\mu\text{L}$ ）	-	-	50
工作液（ $\mu\text{L}$ ）	250	250	250
混匀，95°C水浴 10min，冷却后取 200 $\mu\text{L}$ 于 96 孔板在 620nm 处测定吸光度值，分别记为 A 测定、A 标准、A 空白。分别计算 $\Delta A$ 测定=A 测定-A 空白， $\Delta A$ 标准=A 标准-A 空白。			

## 五、海藻糖含量的计算：

### 1、标准曲线的绘制：

根据标准管的浓度（x，mg/mL）和吸光度  $\Delta A$  标准（y， $\Delta A$  标准），建立标准曲线。将  $\Delta A$  测定（y， $\Delta A$  测定）带入公式计算样本浓度（x，mg/mL）。

### 2、按血清（浆）等液体体积计算：

$$\text{海藻糖含量 (mg/mL)} = (V_1 \times x) \div (V_3 \times V_1 \div V_2) = 10 x$$

### 3、按样本蛋白浓度计算：

$$\text{海藻糖含量(mg/mg prot)} = V_1 \times x \div (V_1 \times \text{Cpr}) = x \div \text{Cpr}$$

### 4、按样本质量计算：

$$\text{海藻糖含量(mg/g 质量)} = V_1 \times x \div (W \times V_1 \div V_2) = x \div W$$

### 5、按细胞/细菌数量计算：

$$\text{海藻糖含量(mg/10}^4 \text{ cell)} = (V_1 \times x) \div (500 \times V_1 \div V_2) = x \div 500$$

$V_1$ ：加入反应体系中样本体积，0.05mL； $V_2$ ：提取液总体积，1mL； $V_3$ ：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。

## 六、注意事项：

- 1、为保证结果准确且避免试剂损失，测定前请仔细阅读说明书（以实际收到说明书内容为准），确认试剂储存和准备是否充分，操作步骤是否清楚，且务必取 2-3 个预期差异较大的样本进行预测定。
- 2、如果测定吸光值超过线性范围吸光值，可以增加样本量或者稀释样本后再进行测定。计算时注意同步修改计算公式。