

海藻糖含量(酶法)试剂盒

规格：100管/96样

检测原理：微量法

编号：JLC_K14888

检测波长：505nm

注意

正式测定前务必取 3 - 5 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

通过海藻糖酶特异性水解海藻糖分解成两分子葡萄糖，再用葡萄糖氧化酶催化葡萄糖氧化成葡萄糖酸，并产生过氧化氢；过氧化物酶催化过氧化氢氧化4-氨基安替比林偶联酚，生成有色化合物，在505 nm有特征吸收峰。

自备仪器和用品

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、研钵和蒸馏水

试剂组成和配制

试剂一：液体1.2mL×1支，-20℃避光保存；

试剂二：液体 20ml×1瓶，-20℃避光保存；

试剂三：液体 20ml×1瓶，4℃避光保存；（若出现结冰现象，可37℃水浴溶解后使用）

标准品：0.6mg/mL海藻糖糖溶液5mL×1瓶，4℃避光保存；

样本提取

1、组织的处理：称取0.1g组织样本加入1mL蒸馏水研磨，全部转移到EP管中90℃水浴加热10min。取出冷却至室温后，25℃，10000×g离心10min，取 上清液待测。

2、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）：蒸馏水体积（mL）为500~1000：1的比例（建议500万细菌或细胞加入1mL蒸馏水），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），90℃水浴10分钟（盖紧，防止水分散失），冷却后，8000g，25℃离心10min，取上清液备用。

3、液体样本：澄清的液体可直接测定，若浑浊则离心取上清测定。

测定步骤

- 1、分光光度计或酶标仪预热30min以上，调节波长至505nm，蒸馏水调零。
- 2、混合试剂的配制：使用前将试剂二和试剂三1:1等体积混合，用多少配多少。
- 3、加样表（在EP管或96孔板中加入下列试剂）：

试剂（μL）	空白管	标准管	测定管	对照管
样本			20	20
标准品		20		
蒸馏水	20			10
混合试剂	180	180	180	180
试剂一	10	10	10	

混匀，置37℃（哺乳动物）或25℃（其它物种）避光孵育30min后，于505nm波长处读取吸光度。空白管、标准管、测定管和对照管吸光值分别记为A空白、A标准、A测定和A对照。

空白管和标准管只要做一管。

海藻糖含量计算

1、按样本鲜重计算

$$\text{海藻糖含量 (mg/g 鲜重)} = (A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times C \times V \div W$$

2、按细菌或细胞密度计算

$$\text{海藻糖含量 (mg/ } 10^4 \text{ cell)} = (A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times C \times V \div 500$$

3、按体积计算

$$\text{海藻糖含量 (mg/mL)} = (A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times C$$

C标准：标准管浓度，0.6mg/mL；V：加入提取液体积，1mL；W：样本鲜重，g；500：细菌或细胞总数，500万。

预实验的意义

比色法检测试剂盒预实验非常重要

- 1、确定该试剂盒是否适合客户的样本检测，以免造成试剂盒和样本的浪费（比如低表达处理的样本）；
- 2、熟悉生化试剂盒的操作流程，尤其是初次使用生化试剂盒测定；
- 3、确定样本的处理方法及稀释倍数是否合适；
- 4、了解实验过程中可能出现的实验现象或问题，以便于及时作出调整；
- 5、通过3-5组预实验，判断试剂盒对于样本的适应稀释浓度范围，指导实验样本稀释比例。