

海藻糖含量(酶法)试剂盒

规格： 100 管/48 样

检测原理：微量法

编号： ml301012

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

试剂的组成和配制：

试剂一：液体 0.55mL×1 支，-20℃避光保存；

试剂二：液体 10ml×1 瓶，-20℃避光保存；

试剂三：液体 10ml×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（10⁴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

海藻糖含量 (mg/g 鲜重) = (A 测定-A 对照)÷(A 标准-A 空白)×C×V÷W

2、按细菌或细胞密度计算

海藻糖含量 (mg/ 10⁴ cell)= (A 测定-A 对照)÷(A 标准-A 空白)×C×V÷500

3、按体积计算

海藻糖含量 (mg/mL)= (A 测定-A 对照)÷(A 标准-A 空白)×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最佳适应稀释浓度范围, 指导实验样本稀释比例。