

半乳糖醛酸含量检测试剂盒说明书

(货号：ADS-W-DF020-48 微板法 48 样 有效期：6 个月)

一、指标介绍：

半乳糖醛酸是一种单糖，是果胶酸的组成单位，也是果胶的主要成分，存在于许多食物中，如番石榴、黄蜡豆、普通豌豆和绿豆。

半乳糖醛酸在硫酸溶液中与咔唑进行缩合反应生成紫红色物质，该有色物质在 530nm 处有特征吸收峰，通过测定 530nm 光吸收，进而计算半乳糖醛酸含量。

二、试剂盒组成和配制：

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 60mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 15mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	液体 1mL×1 支	4℃保存	
试剂三	液体 1mL×1 支	4℃避光保存	
标准品	粉剂 mg×1 支	4℃保存	1. 若重新做标曲，则用到该试剂； 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制； 3. 溶解后的标品一周内用完。

三、实验器材：

研钵（匀浆机）、冰盒（制冰机）、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅（烘箱、培养箱、金属浴）、96 孔板、离心管、酶标仪、乙醇、浓硫酸、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

四、指标测定：

建议先选取 1-3 个差异大的样本（例如不同类型或分组）进行预实验，熟悉操作流程，根据预实验结果确定或调整样本浓度，以防造成样本或试剂不必要的浪费！

1、样本提取：

① 组织样本：取 0.1g 组织样本，加 1mL 的 80%乙醇，研磨匀浆，转移至 EP 管中，静置 10 分钟后于 4℃ 下 8000rpm 离心 10min，弃上清留沉淀。向沉淀中加入 1mL 的 80%乙醇，混匀，静置 10 分钟后于 4℃ 下 8000rpm 离心 10 min，弃上清留沉淀。再向沉淀中加入 1 mL 提取液，混匀，沸水浴 1 小时，流水冷却至室温，8000rpm，4℃离心 10min，弃沉淀，取上清液即样本待测。

② 液体样本：可直接测定，或者适当稀释后测定。若浑浊，离心后取上清检测。

③ 细菌/细胞样本：先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；取约 500 万细菌或细胞加入 1mL 的 80%乙醇，超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；8000rpm，25℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照细菌/细胞数量（ 10^4 ）：80%乙醇（mL）为 500~1000：1 的比例进行提取。

2、检测步骤：

2.1：待检液制备：

试剂组分（ μ L）	测定管
样本	200
试剂一	250
混匀，室温孵育 30min，再加试剂二（约 9 μ L）调 PH 至 7-8 之间（用 PH 试纸检测即可），最后再用蒸馏水定容到 0.5mL。即得待检液。	

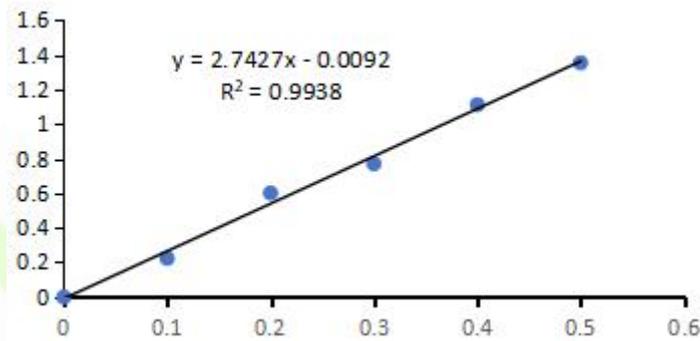
2.2.含量测定：

- ① 打开酶标仪预热 30min（等待仪器过自检程序亦可），调节波长至 530nm；
- ② 在 EP 管中依次加入：

试剂组分 (μL)	测定管	空白管 (仅做一次)
待检液	70	
蒸馏水		70
浓硫酸	420	420
可用封口膜缠紧，85°C水浴 15min 后， 流水冷却至室温。		
试剂三	14	14
混匀，室温 (25°C) 暗处反应 30min (间隔 10min 混匀一次)，立即取出 200μL 于 96 孔中，于 530nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A - \text{测定} - A - \text{空白}$ 。		

3、结果计算：

- 1、标准曲线方程： $y = 2.7427x - 0.0092$ ，x 为标准品浓度 (mg/mL)，y 是 ΔA 。



- 2、半乳糖醛酸含量($\mu\text{mol/g}$ 重量) $= [(\Delta A + 0.0093) \div 2.7424 \times V2 \div V1 \times V \div 194.5 \times 10^3] \div W \times D$
 $= 4.69 \times (\Delta A + 0.0093) \div W \times D$
- 3、半乳糖醛酸含量($\mu\text{mol/mg prot}$) $= [(\Delta A + 0.0093) \div 2.7424 \times V2 \div V1 \times V \div 194.5 \times 10^3] \div Cpr \times D$
 $= 4.69 \times (\Delta A + 0.0093) \div Cpr \times D$
- 4、半乳糖醛酸含量($\mu\text{mol/ml}$) $= [(\Delta A + 0.0093) \div 2.7424 \times V2 \div V1 \div 194.5 \times 10^3] \times D$
 $= 4.69 \times (\Delta A + 0.0093) \times D$
- 5、半乳糖醛酸含量($\mu\text{mol}/10^4$ cell) $= [(\Delta A + 0.0093) \div 2.7424 \times V2 \div V1 \times V \div 194.5 \times 10^3] \div 500 \times D$
 $= 4.69 \times (\Delta A + 0.0093) \div 500 \times D$

W---样本重量，g；

V---加入提取液体积，1mL；

V1---样本体积，0.2mL；

V2---待检液总体积，0.5mL；

Mr---半乳糖醛酸分子量，194.5；

D---稀释倍数，未稀释即为 1。

500---细菌或细胞总数，500 万；

Cpr---上清液蛋白质浓度 (mg/mL)，建议使用本公司 BCA 蛋白质含量测定试剂盒。

附：标准曲线制作过程：

- 1 标曲为非必做实验，用户可根据实验需求制作标曲，亦可直接采用说明书计算公式进行结果计算。

- 2 制备标准品母液 (5mg/mL) : 临用前向标准品中加入 2mL 蒸馏水 (现配现用)。
- 3 将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品, 例如: 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5mg/mL。也可根据实际样本调整标准品浓度。
- 4 标品稀释参照表如下:

吸取标准品母液 100 μ L, 加入 900 μ L 蒸馏水, 混匀得到 0.5. mg/mL 的标品稀释液待用。

标品浓度 mg/mL	0	20	40	60	80	100
标品稀释液 uL	0	40	80	120	160	200
蒸馏水 uL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

- 5 依据测定管的加样表操作, 根据结果, 以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值, 过 0 点制作标准曲线。

试剂组分 (μ L)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	70	
蒸馏水		70
浓硫酸	420	420
可用封口膜缠紧, 85°C水浴 15min 后, 流水冷却至室温。		
试剂一	14	14
混匀, 室温 (25°C) 暗处反应 30min (间隔 10min 混匀 一次), 立即取出 200 μ L 于 96 孔中, 于 530nm 处读取 吸光值 A, $\Delta A = A_{\text{标准}} - A_0$ 浓度。		