

半乳糖醛酸含量检测试剂盒说明书

(货号: ADS-W-DF020 微板法 96 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 100mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 25mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	液体 1.5mL×1 支	4℃保存	
试剂三	液体 2mL×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 (μL)	测定管
样本	200
试剂一	250
混匀, 室温孵育 30min, 再加试剂二 (约 9μL) 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。	

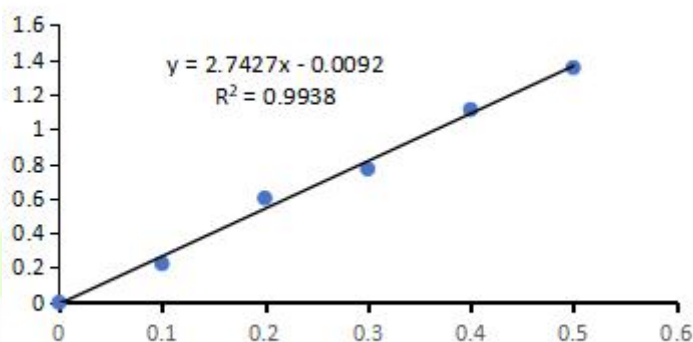
2.2.含量测定:

- 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℃水浴 15min 后，流水冷却至室温。		
试剂三	14	14
混匀，室温（25℃）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($\mu\text{mol/mg prot}$) $= [(\Delta A + 0.0093) \div 2.7424 \times V2 \div V1 \times V \div 194.5 \times 10^3] \div \text{Cpr} \times D$
 $= 4.69 \times (\Delta A + 0.0093) \div \text{Cpr} \times D$
- 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 100uL，加入 900μL 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 (μL)	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 200μL 于 96 孔中，于 530nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{标准}} - A_0$ 浓度。		