

## β-葡聚糖含量测定试剂盒说明书

(货号:ADS-W-TDX045 微板法 48 样 有效期: 6 个月)

### 一、指标介绍:

β-葡聚糖化学名称为: (1-3) (1-4)-β-D-葡聚糖, 是一类非淀粉多糖。

本试剂盒利用葡聚糖酶和β-葡萄糖苷酶对样品中的(1-3) (1-4)-β-D-葡聚糖的酶解作用, 由地衣聚糖酶转一性地水解β-葡聚糖成寡糖, β-葡萄糖苷酶则将寡糖水解成葡萄糖; 葡萄糖被特异性氧化以产生与显色剂反应的(粉)红色产物, 该产物在 510nm 有最大吸收峰, 进而计算得出β-葡聚糖含量。

### 二、测试盒组成和配制:

| 试剂组分 | 试剂规格        | 存放温度     | 注意事项                                                                                                                                        |
|------|-------------|----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 试剂一  | 自备          | 4℃保存     | 1. 50%乙醇:取 4mL 乙醇加 4mL 蒸馏水, 混匀。                                                                                                             |
| 试剂二  | 液体 55mL×1 瓶 | 4℃保存     |                                                                                                                                             |
| 试剂三  | 液体 1 瓶      | -20℃保存   | 1. 开盖前注意使液体落入底部(可手动甩一甩);<br>2. 加入 2.1mL 试剂二, 混匀备用;<br>3. 保存周期与试剂盒有效期相同。                                                                     |
| 试剂四  | 液体 60mL×1 瓶 | 4℃避光保存   |                                                                                                                                             |
| 试剂五  | 液体 8mL×1 瓶  | 4℃避光保存   |                                                                                                                                             |
| 试剂六  | 液体 1 支      | -20℃保存   | 1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底(可手动甩一甩);<br>2. 加入 0.55mL 试剂五, 混匀备用;<br>3. 保存周期与试剂盒有效期相同。                                                  |
| 试剂七  | 粉体 1 瓶      | -20℃避光保存 | 1. 开盖前注意使粉体落入底部(可手动甩一甩);<br>2. 加入 2.2mL 蒸馏水, 混匀备用;<br>3. 保存周期与试剂盒有效期相同。                                                                     |
| 试剂八  | 液体 22mL×1 瓶 | 4℃避光保存   |                                                                                                                                             |
| 标准品  | 粉体 1 支      | 室温干燥保存   | 1. 准确称取 2mg 标准品(葡萄糖)至一新 EP 管中;<br>2. 加入 1mL 试剂五充分溶解即得 2mg/mL 标准品;<br>3. 再用试剂五稀释 4 倍至 0.5mg/mL 备用。(该标准品粉体开封后也需干燥保存和使用);<br>4. 保存周期与试剂盒有效期相同。 |
| 质控品  | 粉体 1 支      | 室温保存     | 1. 质控品为大麦粉(含 4.1%葡聚糖, 含水率为 10.9%), 用于鉴定整个操作过程是否正确。                                                                                          |

### 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、无水乙醇、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、样本上清液制备:

a 组织样本:

- ① 准确称取过 50 目筛的烘干均匀的粉末样本 15mg 至 EP 管底部。
- ② 向上述含样本 EP 中加入 40μL 试剂一，涡旋震荡分散后，再加 0.8mL 试剂二，95℃沸水浴 3min（间隔 1min 混匀一次）（不能产生凝胶状，否则重新制备），取出后降温至 50℃。
- ③ 加 40μL 试剂三，涡旋震荡混匀后，于恒温振荡培养箱中 50℃，200rpm 往复振荡 60min。
- ④ 取出加入 1mL 试剂四混匀，静置 5-10 min 冷却至室温，1000g 室温离心 10min，取上清备用。

b 液体样本:

- ① 澄清的液体样本 (PH6-8) 直接检测；若浑浊，离心后取上清检测。
- ② 取澄清的液体样本 200μL 至 EP 管中，再加入 640μL 试剂二混匀，于 95℃沸水浴 3min（间隔 1min 混匀一次）（不能产生凝胶状，否则重新制备），取出后降温至 50℃。
- ③ 加 40μL 试剂三，涡旋震荡混匀后，于恒温振荡培养箱中 50℃，200rpm 往复振荡 60min。
- ④ 取出加入 1mL 试剂四混匀，静置 5-10 min 冷却至室温，1000g 室温离心 10min，取上清备用。

2、检测步骤:

- ① 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 510nm。
- ② 所有试剂解冻至室温 (25℃)，标准品配制成 0.5mg/mL 待测。
- ③ 在 96 板中依次加入:

| 试剂组分 (μL)                                                                                   | 测定管 | 对照管 | 标准管<br>(只做一次) | 空白管<br>(只做一次) |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----|---------------|---------------|
| 上清液                                                                                         | 10  | 10  |               |               |
| 标准品                                                                                         |     |     | 10            |               |
| 试剂六                                                                                         | 10  |     |               |               |
| 试剂五                                                                                         | 30  | 40  | 40            | 50            |
| 混匀，50℃孵育 20min                                                                              |     |     |               |               |
| 试剂七                                                                                         | 20  | 20  | 20            | 20            |
| 试剂八                                                                                         | 200 | 200 | 200           | 200           |
| 混匀，50℃孵育 20min，在 510nm 处读取吸光值。<br>$\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照}}$ (每个样本一个自身对照)。 |     |     |               |               |

【注】：若  $\Delta A$  低于 0.005，可增加加样体积 V1（如增至 30μL，则试剂五相应减少；标准管和空白管加样体系不变），或增加取样质量 W（如增至 30mg）。则改变后 V1 和 W 需代入公式重新计算。

五、结果计算:

1、按样本鲜重计算:

$$\beta\text{-葡聚糖含量(mg/g 干重)} = (C_{\text{标}} \times V1) \times \Delta A \div (A_{\text{标准品}} - A_{\text{空白管}}) \div (V1 \div V \times W) \times 0.9 \times D$$

$$= 0.846 \times \Delta A \div (A_{\text{标准品}} - A_{\text{空白管}}) \div W \times D$$

2、按照液体体积计算:

$$\beta\text{-葡聚糖含量(mg/mL)} = (C_{\text{标}} \times V1) \times \Delta A \div (A_{\text{标准品}} - A_{\text{空白管}}) \div (V1 \div V \times V2) \times 0.9 \times D$$

$$= 0.846 \times \Delta A \div (A_{\text{标准品}} - A_{\text{空白管}}) \div V2 \times D$$

3、按蛋白浓度计算:

$$\beta\text{-葡聚糖含量(mg/mg prot)} = (C_{\text{标}} \times V1) \times \Delta A \div (A_{\text{标准品}} - A_{\text{空白管}}) \div (V1 \div V \times C_{\text{pr}}) \times 0.9 \times D$$

$$= 0.846 \times \Delta A \div (A_{\text{标准品}} - A_{\text{空白管}}) \div C_{\text{pr}} \times D$$

$C_{\text{标}}$ ---标准品浓度，0.5mg/mL;

V---样品上清液总体积，1.88mL;

V1---测定时所取样品的体积，0.01mL;

V2---液体样本的取样量，200μL=0.2mL;

D---自行稀释倍数，未稀释即为 1;

W---样本干重，g;

0.9---葡萄糖转化为 $\beta$ -葡聚糖的脱水转换因子;

Cpr---蛋白浓度 (mg/mL) ; 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。

