

石斛总生物碱含量测定试剂盒说明书

(货号: BP10059W 微板法 96 样 有效期: 6 个月)

一、指标介绍:

生物碱是存在于生物体内的含氮有机化合物, 大多数存在于植物中, 目前已分离到三千余种, 其中近百种具有很强的生理活性, 广泛应用于临床医疗。

利用生物碱与溴甲酚绿反应生成黄色物质, 该物质在 415nm 有特征吸收峰, 通过检测 415nm 的增加量即可得出样本中总生物碱含量。

二、试剂盒组分与配制:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 3mL×1 瓶	4℃避光保存	1. 临用前按照二氯甲烷: 甲醇: 提取液 (试剂盒提供) 以 40:10:1 的比例混匀, 备用; 2. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂一	A: 粉体 mg×1 支	4℃避光保存	
	B: 液体 1mL×1 支	4℃保存	
试剂二	液体 9.4mL×1 瓶	4℃避光保存	
试剂三	液体 20mL×1 瓶	4℃避光保存	
标准品	粉体 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 UV 板、离心管、酶标仪、二氯甲烷、甲醇、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、样本提取:

① 样本经 60℃ 烘干, 打碎过筛, 取 0.05 g 过筛后样本至 2mLEP 管中, 加入 1mL 提取液, 室温震荡提取 30 min, 超声提取 30 min (间隔 3min 拿出震荡 1min 再继续超声); 最终用提取液补足至 1mL 液面位置, 然后室温 4000rpm 离心 10min, 取上清液测定。

② 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 提取液, 室温震荡提取 30 min, 超声提取 30 min (间隔 3min 拿出震荡 1min 再继续超声); 最终用提取液补足至 1mL 液面位置, 然后室温 4000rpm 离心 10min, 取上清液测定。

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

③ 液体样本: 直接检测; 若浑浊, 离心后取上清检测。

2、检测步骤:

① 酶标仪预热 30min 以上 (等仪器过自检程序亦可), 调节波长至 415nm。

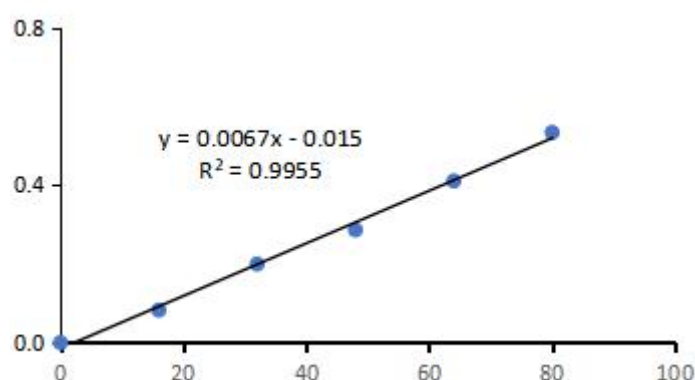
② 临用前配置工作液: 取 0.6mL 试剂一 B 液至 A 中, 混匀完全溶解。再将溶解后的 0.6mL 液体全部转移至试剂二中, 混匀备用。在 EP 管中依次加入:

试剂组分 (μL)	测定管	空白管 (仅做一次)
样本	40	
二氯甲烷	400	440
试剂三	200	200
工作液	80	80
上下震荡 (手动) 5min, 室温 (25℃) 静置 30min, 取下层 200μL 澄清液体至 96 孔 UV 板中, 若下层浑浊可 12000rpm 室温离心 3min, 取澄清下层溶液于 415nm 处快速读取吸光值 A, $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$ 。		

- 【注】：1. 若 ΔA 差值低于 0.01, 可增加样本取样质量 W 或加大样本体积 V1 (如增至 100μL, 则二氯甲烷相应减少), 则改变后的 W 和 V1 需代入计算公式重新计算。
2. 若 A 测定大于 1, 可对样本上清用二氯甲烷稀释, 则稀释倍数 D 代入公式计算。

五、结果计算：

- 1、标准曲线方程： $y = 0.0067x - 0.015$; x 为标准品质量 (μg/mL) ; y 为 ΔA 。



- 2、按照样本质量计算：

$$\begin{aligned} \text{总生物碱含量}(\mu\text{g/g 重量}) &= [(\Delta A + 0.015) \div 0.0067 \times V1] \div (W \times V1 \div V) \times D \\ &= 149.25 \times (\Delta A + 0.015) \div W \times D \end{aligned}$$

- 3、按照蛋白浓度计算：

$$\begin{aligned} \text{总生物碱含量}(\mu\text{g/mg Prot}) &= [(\Delta A + 0.015) \div 0.0067 \times V1] \div (Cpr \times V1 \div V) \times D \\ &= 149.25 \times (\Delta A + 0.015) \div Cpr \times D \end{aligned}$$

- 4、按照液体计算：

$$\begin{aligned} \text{总生物碱含量}(\mu\text{g/mL}) &= [(\Delta A + 0.015) \div 0.0067 \times V1] \div V1 \times D \\ &= 149.25 \times (\Delta A + 0.015) \times D \end{aligned}$$

- 5、按细菌或细胞数量计算：

$$\begin{aligned} \text{总生物碱含量}(\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A + 0.015) \div 0.0067 \times V1] \div (500 \times V1 \div V) \times D \\ &= 149.25 \times (\Delta A + 0.015) \div 500 \times D \end{aligned}$$

V---提取液的总体积, 1mL;

V1---加入反应体系样本体积, 0.04mL;

W---样品质量, g;

D---稀释倍数, 未稀释即为 1。

500---细菌或细胞总数, 万

Cpr---样本蛋白质浓度, mg/mL, 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。

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 (1mg/mL)：标准管用前先甩几下或离心使粉体落入底部，再向 EP 管中加入 1mL 二氯甲烷溶解
- 3 将母液用二氯甲烷稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0，16，32，48，64，80 μ g/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 120 μ L，加入 1380 μ L 二氯甲烷，混匀得到 80 μ g/mL 的标品稀释液待用。						
标品浓度 μ g/mL	0	16	32	48	64	80
标品稀释液 μ L	0	40	80	120	160	200
二氯甲烷 μ L	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	40	
二氯甲烷	400	440
试剂三	200	200
工作液	80	80
上下震荡 (手动) 5min，室温 (25 $^{\circ}$ C) 静置 30min，取下层 200 μ L 澄清液体至 96 孔 UV 板中，于 415nm 处快速读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{标准}} - A_{\text{0 浓度}}$ 。		