

甜菜碱（Betaine）含量试剂盒说明书

（货号：BP10069W 微板法 96 样 有效期：6 个月）

一、指标介绍：

甜菜碱是一种广泛分布于动植物及微生物体内的生物碱。其在强酸条件下和雷氏盐发生反应产生红色沉淀，沉淀用丙酮溶解形成粉红色溶液，在 525nm 处有特征吸收峰，测定 525nm 处的吸光值，可计算得样品的甜菜碱含量。

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	粉剂 2 瓶	4℃避光保存	每瓶： 1. 开盖前注意使试剂落入底部（可手动甩一甩）； 2. 加入 6mL 蒸馏水溶解，加 120μL L 浓盐酸调 pH 为 1； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
99%石油醚	自备	4℃保存	1. 5.94mL 石油醚（60-90℃），加 0.06mL 蒸馏水，混匀。
70%丙酮	自备	4℃保存	1. 丙酮：蒸馏水=7:3
标准品	粉剂 1 支	-20℃避光保存	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。

【注】：试剂一配制时 pH 严格控制为 1，否则会导致反应不完全，配制后尽快使用。

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、**甲醇、石油醚、盐酸、丙酮**、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：

取烘干后过 60 目筛的样品约 0.1g 或称取约 0.2g 鲜样；加 1mL 的 80%甲醇溶液，置于 60℃提取 30min，期间不断震荡。12000rpm，25℃离心 15min，取上清液待测。

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 1mL 的 80%甲醇溶液，置于 60℃提取 30min，期间不断震荡。12000rpm，25℃离心 15min，取上清液待测。

【注】：若增加样本量，可按照细菌/细胞数量（10⁴）：提取液（mL）为 500~1000：1 的比例进行提取。

③ 液体样本：若是澄清液体样本则直接检测，若是浑浊液体则需离心后取上清液测定。

2、检测步骤：

① 酶标仪预热 30min（等待仪器过自检程序亦可），调节波长至 525nm。

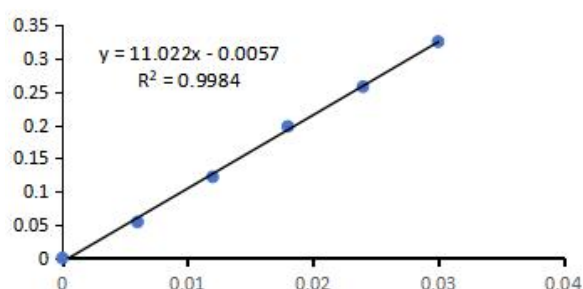
② 在 EP 管中按照下表依次加试剂：

试剂 (μL)	测定管	空白管 (只做一次)
样本	30	
蒸馏水		30
试剂一	100	100
混匀, 4°C反应 2h, 12000rpm, 25°C离心 15min, 弃上清 (上清液可用移液器移除, 务必完全移除。)		
99%石油醚	100	100
12000rpm, 25°C离心 10min, 弃上清, 可继续置于 60°C烘箱中 (约 30min), 至风干为止。		
70%丙酮	200	200
震荡使沉淀充分溶解, 取 200μL 于 96 孔板中, 在 525nm 处测定, $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$ 。		

【注】：若 ΔA 较小在零附近徘徊, 可增加样本取样质量 W 或加样表中样本加样体积 V1, 则改变后的 W 和 V1 需代入计算公式重新计算。

五、结果计算：

1、标准曲线方程： $y = 11.022x - 0.0057$ ；x 是标准品的质量 (mg)；y 是 ΔA 。



2、按照质量计算：

$$\begin{aligned} \text{甜菜碱含量 (mg/g 干重)} &= [(\Delta A + 0.0057) \div 11.022] \div (W \times V1 \div V) \\ &= 3.02 \times (\Delta A + 0.0057) \div W \end{aligned}$$

3、按照蛋白浓度计算：

$$\begin{aligned} \text{甜菜碱含量 (mg/mg Prot)} &= [(\Delta A + 0.0057) \div 11.022] \div (Cpr \times V1 \div V) \\ &= 3.02 \times (\Delta A + 0.0057) \div Cpr \end{aligned}$$

4、按液体体积计算：

$$\text{甜菜碱含量 (μg/mL)} = [(\Delta A + 0.0057) \div 11.022] \div V1 \times 10^3 = 3024.25 \times (\Delta A + 0.0057)$$

5、按细胞数量计算：

$$\begin{aligned} \text{甜菜碱含量 (μg/10}^4 \text{ cell)} &= [(\Delta A + 0.0057) \div 11.022] \div (500 \times V1 \div V) \times 10^3 \\ &= 6.05 \times (\Delta A + 0.0057) \end{aligned}$$

V1---反应中样本体积, 0.03mL; V---加入提取液体积, 1mL;
W---样本质量, g; 500---细胞数量, 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): 向标准品 EP 管里面加入 1mL 蒸馏水 (母液需在两天内用且-20℃保存)
- 3 将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品, 例如: 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1mg/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:

标品浓度 mg/mL	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
标品母液 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 (μL)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	30	
蒸馏水		30
试剂一	100	100
混匀, 4℃反应 2h, 12000rpm, 25℃离心 15min, 弃上清 (上清液可用移液器移除, 务必完全移除。)		
99%石油醚	100	100
12000rpm, 25℃离心 10min, 弃上清, 可继续置于 60℃烘箱中 (约 30min), 至风干为止。		
70%丙酮	200	200
震荡使沉淀充分溶解, 取 200μL 于 96 孔板中, 在 525nm 处测定, $\Delta A = A_{\text{标准}} - A_{0 \text{ 浓度}}$		