

β-葡聚糖含量测定试剂盒说明书

(货号:BP10320W 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); 2. 加入 2.1mL 试剂二, 混匀备用; 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); 2. 加入 0.55mL 试剂五, 混匀备用; 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); 2. 加入 2.2mL 蒸馏水, 混匀备用; 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; 2. 加入 1mL 试剂五充分溶解即得 2mg/mL 标准品; 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); 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 （只做一次）	空白管 （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。 ΔA=A 测定管-A 对照（每个样本一个自身对照）。				

【注】：若ΔA 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：

$$\beta\text{-葡聚糖含量(mg/mg prot)} = (C_{\text{标}} \times V1) \times \Delta A \div (A_{\text{标准品}} - A_{\text{空白管}}) \div (V1 \div V \times Cpr) \times 0.9 \times D \\ = 0.846 \times \Delta A \div (A_{\text{标准品}} - A_{\text{空白管}}) \div Cpr \times D$$

C_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 β -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。