

## 甜菜碱 (Betaine) 含量试剂盒说明书

(货号: ADS-W-QT006 微板法 96 样)

### 一、产品简介:

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:

试剂名称	规格	保存要求	备注
试剂一	粉剂 2 瓶	4°C 保存	临用前, 每瓶加 6mL 蒸馏水溶解, 加 120 $\mu$ L L 浓盐酸调 pH 为 1。
99% 石油醚	自备	4°C 保存	5.94mL 石油醚 (60-90°C), 加 0.06mL 蒸馏水, 混匀。
70% 丙酮	自备	4°C 保存	丙酮: 蒸馏水=7:3
标准品	粉剂 1 支	-20°C 保存	若重新做标曲, 则用到该试剂

【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、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、天平、离心机、可调式移液器、甲醇、石油醚、盐酸、丙酮和蒸馏水。

### 四、甜菜碱含量测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

#### 1、样本制备:

##### 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°C 提取 30min, 期间不断震荡。12000rpm, 25°C 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°C 提取 30min, 期间不断震荡。12000rpm, 25°C 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 ( $10^4$ ): 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、上机检测:

① 酶标仪预热 30min, 调节波长至 525nm。

② 在 EP 管中按照下表依次加试剂:

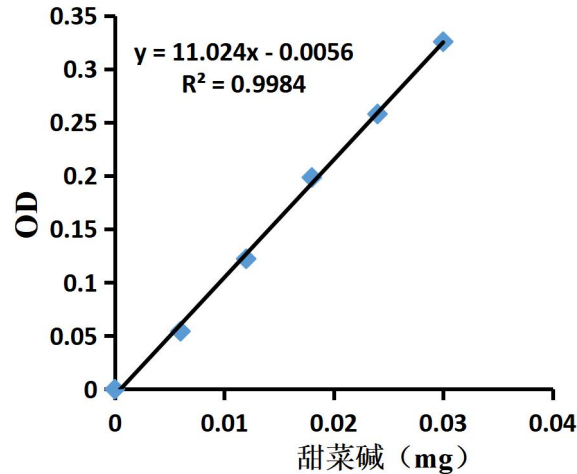
试剂 ( $\mu$ L)	测定管	空白管 (只做一次)
样本	30	
蒸馏水		30
试剂一	100	100
混匀, 4°C 反应 2h, 12000rpm, 25°C 离心 15min, 弃上清 (上清液可用移液器移除, 务必完全移除。)		
99% 石油醚	100	100
12000rpm, 25°C 离心 10min, 弃上清, 可继续置于 60°C 烘箱中 (约 30min), 至风干为止。		
70% 丙酮	200	200

震荡使沉淀充分溶解，取 200 $\mu$ L 于 96 孔板中，在 525nm 处测定， $\Delta A=A$  测定-A 空白。

【注】：若 $\Delta A$  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： $y=11.024x-0.0056$ ；x 是标准品的质量 (mg)；y 是 $\Delta A$ 。



2、按照质量计算：

$$\begin{aligned} \text{甜菜碱含量(mg/g 干重)} &= [(\Delta A + 0.0056) \div 11.024] \div (W \times V1 \div V) \\ &= 3.02 \times (\Delta A + 0.0056) \div W \end{aligned}$$

3、按细胞数量计算：

$$\begin{aligned} \text{甜菜碱含量}(\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A + 0.0056) \div 11.024] \div (500 \times V1 \div V) \times 10^3 \\ &= 6.05 \times (\Delta A + 0.0056) \end{aligned}$$

4、按液体体积计算：

$$\text{甜菜碱含量}(\mu\text{g/mL}) = [(\Delta A + 0.0056) \div 11.024] \div V1 \times 10^3 = 3023.3 \times (\Delta A + 0.0056)$$

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；

附：标准曲线制作过程：

- 1 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 $^{\circ}$ C 保存)。
- 2 把母液稀释成六个浓度梯度的标准品：0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1. mg/mL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 依据测定管的加样表操作，根据结果即可制作标准曲线。