

β-葡聚糖含量测定试剂盒说明书

(分光法 24 样)

一、产品简介：

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，由地衣聚糖酶专一地水解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、试剂盒的组成和配制：

试剂名称	规格	保存要求	备注
试剂一	自备	4℃保存	50%乙醇：取 4mL 乙醇加 4mL 蒸馏水，混匀。
试剂二	液体 25mL×1 瓶	4℃保存	
试剂三	液体 μL×1 支	-20℃保存	临用前甩几下使液体全部落入底部，加入 1.05mL 试剂二，混匀备用。
试剂四	液体 25mL×1 瓶	4℃保存	
试剂五	液体 8mL×1 瓶	4℃保存	
试剂六	液体 μL×1 支	-20℃保存	临用前甩几下使液体全部落入底部，加入 0.7mL 试剂五，混匀备用。
试剂七	粉体 mg×1 支	-20℃保存	临用前甩几下使粉体全部落入瓶底，加入 3mL 蒸馏水，混匀备用。
试剂八	液体 38mL×1 瓶	4℃保存	
标准品	粉体 mg×1 支	4℃保存	准确称取 2mg 标准品（葡萄糖）至一新 EP 管中，再加 1mL 试剂五充分溶解即得 2mg/mL 标准品，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)
质控品	粉体 mg×1 支	室温保存	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、所需的仪器和用品：

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）、恒温水浴锅、离心机、可调式移液器、无水乙醇和蒸馏水。

四、β-葡聚糖含量检测：

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 200 μ L 至 EP 管中,再加入 640 μ L 试剂二混匀,于 95 $^{\circ}$ C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 $^{\circ}$ C。
- ③ 加 40 μ L 试剂三,涡旋震荡混匀后,于恒温振荡培养箱中 50 $^{\circ}$ C,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、上机检测:

- ① 可见分光光度计预热 30min 以上,调节波长至 510nm,蒸馏水调零。
- ② 所有试剂解冻至室温 (25 $^{\circ}$ C),标准品配制成 0.5mg/mL 待测。
- ③ 在 EP 管中依次加入:

试剂名称 (μ L)	测定管	对照管	标准管 (只做一次)	空白管 (只做一次)
上清液	25	25		
标准品			25	
试剂六	25			
试剂五	80	105	105	130
混匀, 50 $^{\circ}$ C 孵育 20min				
试剂七	50	50	50	50
试剂八	620	620	620	620
混匀, 50 $^{\circ}$ C 孵育 20min, 在 510nm 处读取吸光值。 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照}}$ (每个样本一个自身对照)。				

【注】: 若 ΔA 低于 0.01, 可增加加样体积 V_1 (如增至 50 μ L, 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 V_1 和 W 需代入公式重新计算。

五、结果计算:

1、按样本鲜重计算:

$$\beta\text{-葡聚糖含量(mg/g 干重)} = (C_{\text{标}} \times V_1) \times \Delta A \div (A_{\text{标准品}} - A_{\text{空白管}}) \div (V_1 \div V \times W) \times 0.9 \times D$$

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

2、按照液体体积计算:

$$\beta\text{-葡聚糖含量(mg/mL)} = (C_{\text{标}} \times V_1) \times \Delta A \div (A_{\text{标准品}} - A_{\text{空白管}}) \div (V_1 \div V \times V_2) \times 0.9 \times D$$

$$= 0.846 \times \Delta A \div (A_{\text{标准品}} - A_{\text{空白管}}) \div V_2 \times D$$

$C_{\text{标}}$ --标准品浓度, 0.5mg/mL;

V ---样品上清液总体积, 1.88mL;

V_1 ---测定时所取样本的体积, 0.025mL;

V_2 ---液体样本的取样量, 200 μ L=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。