

## 甜菜碱（Betaine）含量试剂盒说明书

（货号：G0122W 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 mg×2 瓶 | 4℃保存   | 临用前，每瓶加 6mL 蒸馏水溶解，加 120μL L 浓盐酸调 pH 为 1。 |
| 99%石油醚 | 自备        | 4℃保存   | 5.94mL 石油醚（60-90℃），加 0.06mL 蒸馏水，混匀。      |
| 70%丙酮  | 自备        | 4℃保存   | 丙酮：蒸馏水=7:3                               |
| 标准品    | 粉剂 mg×1 支 | -20℃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，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（10<sup>4</sup>）：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：

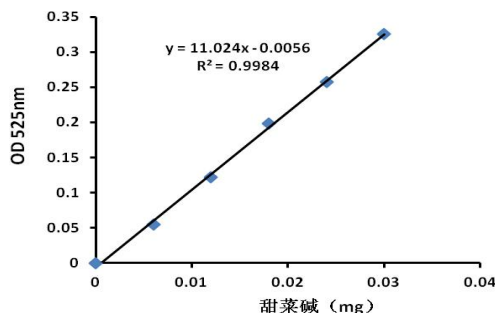
| 试剂（μL）                                                  | 测定管 | 空白管（只做一次） |
|---------------------------------------------------------|-----|-----------|
| 样本                                                      | 30  |           |
| 蒸馏水                                                     |     | 30        |
| 试剂一                                                     | 100 | 100       |
| 混匀，4℃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 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：

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

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℃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。