

β-葡聚糖 (β-Glucan) 含量

<编号: BGL-W48-N(1620) 微量法 100 管/48 样>

注 意: 正式测定前务必取 3 - 5 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义:

β-葡聚糖是由葡萄糖单位组成的多聚糖, 它们大多数是通过β-1,3 结合, 天然存在于真菌、细菌和植物的细胞壁中。

测定原理:

依次使用地衣聚糖酶和β-葡萄糖苷酶水解β-葡聚糖生成葡萄糖, 然后使用 GOD-POD 试剂测定葡萄糖的含量。

自备仪器和用品:

酶标仪、水浴锅、可调式移液器、96 孔板、研钵、乙醇和蒸馏水。

试剂清单:

试剂名称	规格	数目	贮藏
试剂一	液体 60mL	x1	4℃
试剂二	液体 μL	x1	-20℃,避光
试剂三	液体 60mL	x1	4℃
试剂四	液体 12mL	x1	4℃
试剂五	粉剂 mg	x1	-20℃,避光
试剂六	液体 12mL	x1	-20℃,避光
试剂七	液体 12mL	x1	4℃,避光

样品提取（按照步骤依次操作）：

一、燕麦、小麦、纤维等干样

- 1、样本充分烘干粉碎，过 40 目以上筛；
- 2、取 0.05g 左右样本，加入 1mL 80%乙醇，充分震荡混匀后，95℃水浴加热 5min；
- 3、取出冷却至室温，25℃ 3000g 离心力 离心 10min，去除上清；
- 4、沉淀中加入 0.8mL 试剂一，充分震荡混匀，95℃水浴加热 5min；
- 5、取出冷却至室温，加入 50μL 试剂二，混匀后 50℃反应 60min；
- 6、反应结束后加入 1mL 试剂三，充分混匀；
- 7、然后 25℃ 5000g 离心力 离心 10min，取上清待测。

二、发酵液等液体样本

- 1、取 0.5mL 样本，95℃水浴加热 5min；
- 2、取出冷却至室温后，分次缓慢加入 0.8mL 95%乙醇，充分混匀；
- 3、然后 25℃ 3000g 离心力 离心 10min，去除上清；
- 4、沉淀中再加入 0.8mL 50%乙醇，混匀；
- 5、再次 25℃ 3000g 离心力 离心 10min，去除上清；
- 6、沉淀中加入 0.8mL 试剂一，再加入 50μL 试剂二，混匀后 50℃反应 60min；
- 7、反应结束后加入 1mL 试剂三，充分混匀；
- 8、然后 25℃ 5000g 离心力 离心 10min，取上清待测。

实验准备：

- 1、酶标仪预热 30min，调节波长至 505nm。
- 2、试剂二的制备：临用前加入 3mL 试剂一，充分溶解待用；
- 3、试剂五的制备：临用前加入 6mL 试剂四，充分溶解待用；

试剂二、试剂五、试剂六，不可反复冻融，可按需分装后-20℃保存

- 4、显色液的配制：临用前将试剂六和试剂七按 1：1 的比例混合，现用现配；

测定操作：

- 1、在 EP 管中依次操作

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
样本	100	100
试剂四	-	100
试剂五	100	-
37℃反应 20min，然后 3000g 离心力 离心 5min 取上清液待测（记做 c）		

- 2、在 96 孔板中依次操作

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
上清液 (c 测定)	20	-
上清液 (c 对照)	-	20
显色液	180	180
充分混匀，37℃反应 30min，测定 505nm 处吸光值 A $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$		

结果计算：

标准条件下测定回归方程为 $y=2.321x+0.0053$, $R^2=0.9999$;

x 为标准品浓度 (mg/mL), y 为吸光值。

(1) 按样本质量计算

$$\begin{aligned}\beta\text{-葡聚糖含量(mg/g 干重)} &= (\Delta A - 0.0053) \div 2.321 \times V1 \div (W \times V2 \div V3) \\ &= 1.594 \times (\Delta A - 0.0053) \div W\end{aligned}$$

(2) 按样本体积计算

$$\begin{aligned}\beta\text{-葡聚糖含量(mg/mL)} &= (\Delta A - 0.0053) \div 2.321 \times V1 \div (V4 \times V2 \div V3) \\ &= 3.188 \times (\Delta A - 0.0053)\end{aligned}$$

V1: 反应总体积, 0.2mL;

V4: 液体样本体积, 0.5mL;

V2: 反应体系中样本体积, 0.1mL;

W: 样本质量, g。

V3: 提取液总体积, 1.85mL;

预实验的意义：

比色法检测试剂盒预实验非常重要

- 1、确定该试剂盒是否适合客户的样本检测，以免造成试剂盒和样本的浪费（比如低表达处理的样本）；
- 2、熟悉生化试剂盒的操作流程，尤其是初次使用生化试剂盒测定；
- 3、确定样本的处理方法及稀释倍数是否合适；
- 4、了解实验过程中可能出现的实验现象或问题，以便于及时作出调整；
- 5、通过 3 - 5 组预实验，判断试剂盒对于样本的最佳适应稀释浓度范围，指导实验样本稀释比例。