

甜菜碱（Betaine）含量试剂盒说明书

（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 蒸馏水混匀(可低温超声 20min)，加 120μL 浓盐酸调 pH 为 1，最终为混悬液，临用前摇匀吸取即可。
石油醚	自备	4℃保存	石油醚（60-90℃）。
70%丙酮	自备	4℃保存	丙酮：蒸馏水=7:3。
标准品	粉剂 mg×1 支	4℃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，了解本批样品和实验流程，避免样本和试剂浪费！

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℃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（10⁴）：提取液（mL）为 500~1000：1 的比例进行

- ③ 液体样本：若是澄清液体则直接检测，若是浑浊液体则需离心后取上清液测定。

2、上机检测：

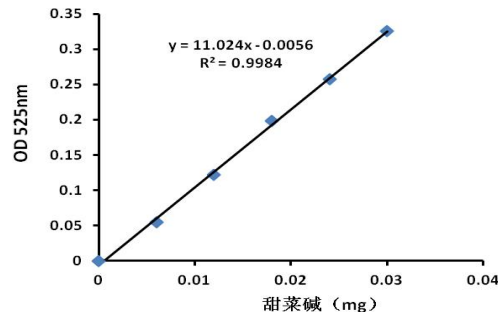
- ① 酶标仪预热 30min，调节波长至 525nm。
- ② 在 EP 管中按照下表依次加试剂：

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）。		
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 200μL 至 96 孔板中，于 525nm 处读值， $\Delta A = A_{测定} - A_{空白}$ 。		

【注】：若 ΔA 小于 0.01，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 ΔA 。



2、按照质量计算：

甜菜碱含量(mg/g 干重)=[$(\Delta A+0.0056)\div 11.024$] $\div (W\times V1\div V)$ = $3.02\times (\Delta A+0.0056)\div W$

3、按细胞数量计算：

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

4、按液体体积计算：

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

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）：称取 2mg 标准品至一新 EP 管，再加 2mL 的蒸馏水混匀溶解，即 1mg/mL 标准品，备用。
- 2 把母液蒸馏水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。