

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（ 10^4 ）：提取液（mL）为 500~1000：1 的比例进行提取。

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：

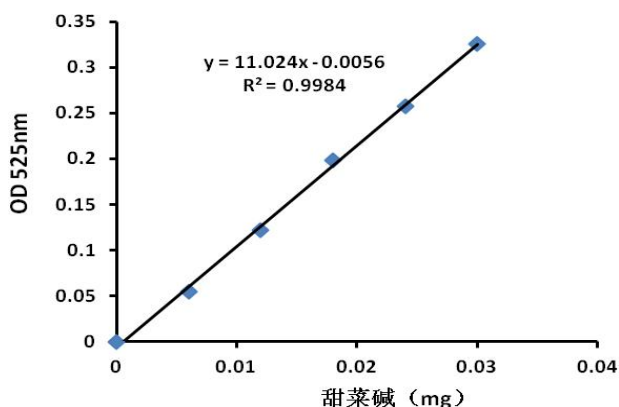
试剂（μL）	测定管	空白管（只做一次）
样本	30	
蒸馏水		30
试剂一	100	100
混匀，4℃ 反应 2h，12000rpm，25℃ 离心 15min，弃上清 （上清液可用移液器移除，务必完全移除。）		
99%石油醚	100	100
12000rpm，25℃ 离心 10min，置于 60℃ 烘箱中（约 30min）， 至风干为止。		
70%丙酮	200	200

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

【注】：若 ΔA 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 ΔA 。



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：

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

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，百万；

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。