海藻糖含量（酶法）检测试剂盒说明书

（分光法 48 样）

一、产品简介：

海藻糖(trehalose)是一种非还原性双糖，广泛存在于动植物、微生物和培养细胞中。具有在干燥、干旱、冷冻、高渗透压等恶劣环境下保护核酸和蛋白质等生物大分子的作用，被广泛用于医药、保健品、酶、食品等制品的保存。

本试剂盒提供一种海藻糖特异检测方法，即先用海藻糖酶特异性水解海藻糖分解成 2 分子葡萄糖，再用 GOPOD 方法检测葡萄糖含量，并且通过校正游离的葡萄糖背景值进而得到海藻糖含量，且其他二糖如麦芽糖和乳糖不会干扰本测定。

二、试剂盒组分与配制：

试剂名称	规格	保存要求	备注
试剂一	液体μL×1 支	-20℃保存	临用前甩几下使液体落入底部，再加 1.1mL 的蒸馏水溶解
试剂二	粉体 mg×1 支	-20℃保存	临用前甩几下使粉体落入底部，再加 2.2mL 的蒸馏水溶解
试剂三	液体 40mL×1 瓶	4℃保存	
试剂四	液体 24mL×1 瓶	4℃保存	
标准管	粉体 mg×1 支	4℃保存	从标准管中称量取出2mg至一新EP管中，再加2mL蒸馏水混匀溶解即1mg/mL的葡萄糖标准品溶液，再用蒸馏水稀释成0.5mg/mL来测定。

三、所需仪器和用品：

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）、天平、可调式移液器、研钵、离心机、蒸馏水。

四、海藻糖含量检测：

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、样本制备：

① 组织样本：

取 0.1g 组织样本（水分充足的样本建议取 0.2g 左右），加 1mL 的约 80℃蒸馏水研磨，粗提液全部转移到 EP 管中，12000rpm，常温离心 10min，

② 细菌/真菌样本：

先收集细菌或真菌到离心管内，离心后弃上清；取 500 万细菌或真菌加入 1mL 约 80℃蒸馏水；冰浴超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 20%或 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次），室温晃动提取 30min， 8000rpm 室温（25℃）离心 10min，取上清。

【注】：若增加样本量，可按照提取液体积(mL) ：细菌或真菌数量(10^4个)为 1：500~1000 的比例提取。

③ 液体样品：

近似中性的澄清液体样本可直接检测；若为酸性样本则需先用 NaOH(2M)调 PH 值约 7.4，然后室温静置 30min，取澄清液体直接检测。

2、上机检测：

① 可见分光光度计预热 30min，设置温度在 25℃，设定波长到 510nm，蒸馏水调零。

② 做实验前可以选取几个样本，找出适合本次检测样本的稀释倍数 D。

③ 在 EP 管中依次加入：

试剂名称（μL）	测定管	对照管	标准管 （仅做一次）	空白管 （仅做一次）
样本	40	40		
标准品			40	
试剂一	20			
试剂二	20	20	20	20
试剂三	400	420	420	460
试剂四	240	240	240	240
混匀，室温（25℃）避光反应 30min，全部液体转移至 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中，于 510nm 下读取吸光值 A， △A 海藻糖=A 测定-A 对照，				

【注】1. 若 A 测定管超过 1.5，可把样本用蒸馏水稀释后再检测，则稀释倍数 D 代入计算公式。

2. 若△A 在零附近徘徊，且 A 测定管低于 1，则可加大样本量 V1（如增至 80μL，则试剂三相应减少），或加大样本取样质量 W（如 0.2g 或更大），则改变后的 V1 和 W 需代入计算公式重新计算。

五、结果计算：

1、按照质量计算：

海藻糖含量(mg/g 鲜重)=(C 标准×V1)×△A 海藻糖÷(A 标准-A 空白) ÷2
×342.3÷180.16÷(W×V1÷V) ×D
=0.475×△A 海藻糖÷(A 标准-A 空白)÷W×D

2、按细菌或真菌密度计算：

海藻糖含量(μg/10^4cell)=(C 标准×V1)×△A 海藻糖÷(A 标准-A 空白) ÷2
×342.3÷180.16÷(细胞数量×V1÷V)
=0.475×△A 海藻糖÷(A 标准-A 空白)÷细胞数量×D

3、按照体积计算：

海藻糖含量(mg/mL)=(C 标准×V1)×△A 海藻糖÷(A 标准-A 空白) ÷2×342.3÷180.16÷V1×D
=0.475×△A 海藻糖÷(A 标准-A 空白)×D

海藻糖分子量---342.3；
葡萄糖分子量---180.16；
C 标准---葡萄糖标准品的浓度，0.5mg/mL；
V---加入提取液体积，1mL；
V1---加入样本体积，0.03mL；
W---样本鲜重，g；
2---1 分子海藻糖分解成 2 分子葡萄糖；
D---稀释倍数，未稀释即为 1。