

海藻糖含量（酶法）检测试剂盒说明书

（微板法 96 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 $\mu\text{L} \times 1$ 支	-20°C 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 $\text{mg} \times 1$ 支	-20°C 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 20mL $\times 1$ 瓶	4°C 保存	
试剂四	液体 16mL $\times 1$ 瓶	4°C 保存	
标准管	粉体 $\text{mg} \times 1$ 支	4°C 保存	临用前甩几下使粉体落入底部，再加 2mL 蒸馏水溶解，即 1mg/mL 葡萄糖溶液。

三、所需仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、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°C 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°C 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°C）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 酶标仪预热 30min，设置温度在 25°C，设定波长到 510nm。

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 96 孔板中依次加入：

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	10	10		
标准品			10	
试剂一	10			
试剂二	10	10	10	10
试剂三	90	100	100	110
试剂四	80	80	80	80
混匀, 室温 (25°C) 避光反应 30min, 510nm 下读取吸光值 A, ΔA 海藻糖=A 测定-A 对照,				

- 【注】1. 若 A 测定管超过 1, 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 ΔA 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 40μL, 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:

$$\begin{aligned} \text{海藻糖含量(mg/g 鲜重)} &= (C \text{ 标准} \times V1) \times \Delta A \text{ 海藻糖} \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \div 2 \\ &\quad \times 342.3 \div 180.16 \div (W \times V1 \div V) \times D \\ &= 0.95 \times \Delta A \text{ 海藻糖} \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \div W \times D \end{aligned}$$

2、按细菌或真菌密度计算:

$$\begin{aligned} \text{海藻糖含量}(\mu\text{g}/10^4\text{cell}) &= (C \text{ 标准} \times V1) \times \Delta A \text{ 海藻糖} \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \div 2 \\ &\quad \times 342.3 \div 180.16 \div (\text{细胞数量} \times V1 \div V) \\ &= 0.95 \times \Delta A \text{ 海藻糖} \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \div \text{细胞数量} \times D \end{aligned}$$

3、按照体积计算:

$$\begin{aligned} \text{海藻糖含量(mg/mL)} &= (C \text{ 标准} \times V1) \times \Delta A \text{ 海藻糖} \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \div 2 \times 342.3 \div 180.16 \div V1 \times D \\ &= 0.95 \times \Delta A \text{ 海藻糖} \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \times D \end{aligned}$$

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, 1mg/mL;

V---加入提取液体积, 1mL;

V1---加入样本体积, 0.01mL;

W---样本鲜重, g;

2---1 分子海藻糖分解成 2 分子葡萄糖;

细胞数量---500 万;

D---稀释倍数, 未稀释即为 1。