

海藻糖含量（酶法）检测试剂盒说明书

（货号：ADS-W-TDX006-96 微板法 96 样 有效期：3 个月）

一、指标介绍：

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：

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
试剂一	液体 1mL×1 支	-20℃避光保存	1. 可-20℃分装冻存，禁止反复冻融； 2. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂二	粉体 1 瓶	-20℃避光保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部（可手动甩一甩）； 2. 加入 2.2mL 的蒸馏水溶解； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂三	液体 20mL×1 瓶	4℃保存	
试剂四	液体 20mL×1 瓶	4℃避光保存	
标准管	粉体 1 支	4℃保存	1. 从标准管中称量取出 2mg 至一新 EP 管中； 2. 加入 2mL 蒸馏水混匀溶解即 1mg/mL 的葡萄糖标准品溶液，备用； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。

三、实验器材：

研钵（匀浆机）、冰盒（制冰机）、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅（烘箱、培养箱、金属浴）、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

四、海藻糖含量检测：

建议先选取 1-3 个差异大的样本（例如不同类型或分组）进行预实验，熟悉操作流程，根据预实验结果确定或调整样本浓度，以防造成样本或试剂不必要的浪费！

1、样本提取：

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、检测步骤：

- ① 酶标仪预热 30min，设置温度在 25℃，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：

试剂组分 (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℃) 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；

C 标准---葡萄糖标准品的浓度，1mg/mL；

V1---加入样本体积，0.01mL；

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。

葡萄糖分子量---180.16；

V---加入提取液体积，1mL；

W---样本鲜重，g；

细胞数量---500 万；