海藻糖含量（酶法）检测试剂盒说明书

（货号：G0553W96 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 1mL×1 支	-20℃保存	可-20℃分装冻存，禁止反复冻融。
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 20mL×1 瓶	4℃保存	
试剂四	液体 16mL×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，备用。

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 的蒸馏水研磨，粗提液全部转移到 EP 管中，再至于 90℃条件下孵育 10min，拿出冷却至室温后，于 8000rpm 室温（25℃）离心 10min，上清液待检测。

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 的蒸馏水，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），再至于 90℃条件下孵育 10min，拿出冷却至室温后，8000rpm 室温（25℃）离心 10min，取上清液待测。

【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℃，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℃）避光反应 30min，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，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 小于 0.01，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：

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

=0.95×△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)

=0.95×△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

=0.95×△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，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。