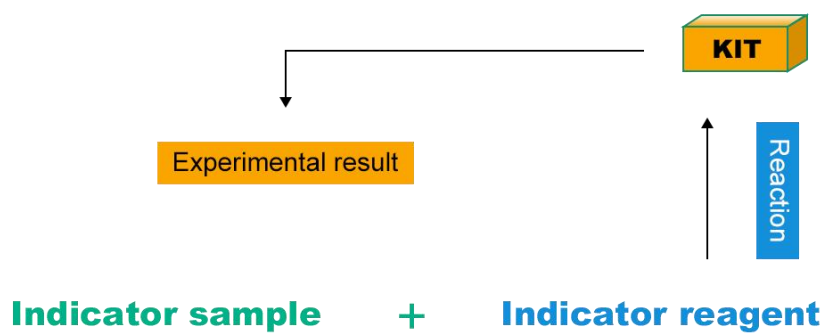


上海茁彩生物科技有限公司  
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0421

Size: 100T/96S

## 海藻糖含量(Trehalose) 检测试剂盒说明书

### 微量法

**\*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定**

#### 一、测定意义：

海藻糖广泛存在于动物、植物、微生物和培养细胞中。由于海藻糖具有独特的不同于其他碳水化合物的生物学特性，能在干旱、高温、脱水、冷冻、高渗透压及毒性物质等恶劣环境下保护生物体细胞蛋白质、脂肪、糖类、核酸等组分不受损害。

#### 二、测定原理：

蒽酮比色法。具有灵敏度高、简便快捷、适用于微量样品的测定等优点。

#### 三、需自备的仪器和用品：

可见分光光度计/酶标仪、水浴锅、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔板、研钵、浓硫酸和蒸馏水。

#### 四、试剂的组成和配置：

| 种类  | 试剂规格         | 储存条件 | 使用方法及注意事项 |
|-----|--------------|------|-----------|
| 提取液 | 液体 100ml×1 瓶 | 4℃保存 |           |
| 试剂一 | 粉剂×1 瓶       | 4℃保存 |           |

## 五、海藻糖提取：

1、细菌或细胞处理：收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；按照细菌或细胞数量 ( $10^4$  个): 提取液体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液), 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), 室温静置 45min, 振荡 3~5 次, 冷却后, 8000g, 25°C 离心 10min, 取上清。

2、组织的处理：按照组织质量 (g): 提取液体积 (mL) 为 1 : 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液), 冰浴匀浆, 室温静置 45min, 振荡 3~5 次, 冷却后, 8000g, 25°C 离心 10min, 取上清。

3、血清 (浆) 的处理：按照血清 (浆) 体积 (mL): 提取液体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例 (建议取 0.1mL 血清 (浆) 加入 1mL 提取液), 冰浴匀浆, 室温静置 45min, 振荡 3~5 次, 冷却后, 8000g, 25°C 离心 10min, 取上清。

## 六、测定步骤：

1、分光光度计或酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 620nm, 蒸馏水调零。

2、调节水浴锅至 95 度。

3、工作液的配制：临用前在试剂一中加入 3.75mL 蒸馏水后, 缓慢加入 21.25mL 浓硫酸, 不断搅拌, 充分溶解, 待用; 用不完的试剂 4°C 保存一周;

4、样本测定：取 60  $\mu$ L 样本和 240  $\mu$ L 工作液至 EP 管中, 95 度水浴 10 min (盖紧, 防止水分散失), 自然冷却至室温, 取 200  $\mu$ L 至微量石英比色皿或 96 孔板中, 在 620 nm 波长下记录测定吸光度值 A。

注意：由于工作液具有强腐蚀性, 请谨慎操作。

若吸光值大于 1, 请将样本用提取液稀释后再测定, 计算公式中乘以相应的稀释倍数。

## 七、海藻糖含量计算：

### a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

1、标准条件下测定回归方程为  $y = 8.8976x + 0.0729$ ； $x$  为标准品浓度 (mg/mL)， $y$  为吸光值。

2、按样本鲜重计算：

$$\text{海藻糖含量 (mg/g 鲜重)} = [V1 \times (A - 0.0729) \div 8.8976] \div (W \times V1 \div V2)$$

$$= 0.112 \times (A - 0.0729) \div W。$$

3、按样本蛋白浓度计算：

$$\text{海藻糖含量 (mg/mg prot)} = [V1 \times (A - 0.0729) \div 8.8976] \div (V1 \times Cpr)$$

$$= 0.112 \times (A - 0.0729) \div Cpr。$$

4、按细菌或细胞密度计算：

$$\text{海藻糖含量} (\mu\text{g}/10^4\text{cell}) = [1000 \times V1 \times (A - 0.0729) \div 8.8976] \div (500 \times V1 \div V2)$$

$$= 0.224 \times (A - 0.0729)$$

5、血清（浆）海藻糖含量计算

$$\text{海藻糖含量 (mg/mL)} = [V1 \times (A - 0.0729) \div 8.8976] \div (V3 \times V1 \div V2) = 1.12 \times (A - 0.0729)$$

1000 : 1mg/mL=1000μg/mL；V1：加入反应体系中样本体积，60 μL=0.06mL；V2：加入提取液总体积 1mL；V3：加入血清（浆体积），0.1mL；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样品质量，g；500：细菌或细胞总数，500 万。

### b. 用 96 孔板测定的计算公式如下

1、标准条件下测定回归方程为  $y = 4.4488x + 0.0729$ ； $x$  为标准品浓度 (mg/mL)， $y$  为吸光值。

2、按样本鲜重计算：

$$\text{海藻糖含量 (mg/g 鲜重)} = [V1 \times (A - 0.0729) \div 4.4488] \div (W \times V1 \div V2)$$

$$= 0.224 \times (A - 0.0729) \div W。$$

### 3、按样本蛋白浓度计算：

$$\text{海藻糖含量 (mg/mg prot)} = [V1 \times (A - 0.0729) \div 4.4488] \div (V1 \times Cpr)$$

$$= 0.224 \times (A - 0.0729) \div Cpr。$$

### 4、按细菌或细胞密度计算：

$$\text{海藻糖含量 (}\mu\text{g}/10^4\text{cell)} = [1000 \times V1 \times (A - 0.0729) \div 4.4488] \div (500 \times V1 \div V2)$$

$$= 0.448 \times (A - 0.0729)$$

### 5、血清（浆）海藻糖含量计算

$$\text{海藻糖含量 (mg/mL)} = [V1 \times (A - 0.0729) \div 4.4488] \div (V3 \times V1 \div V2) = 2.24 \times (A - 0.0729)$$

1000 : 1mg/mL=1000 $\mu$ g/mL; V1: 加入反应体系中样本体积, 60  $\mu$ L=0.06mL; V2: 加入提取液总体积 1mL;; V3 : 加入血清（浆体积）, 0.1mL; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量, g; 500 : 细菌或细胞总数, 500 万。

**注意：最低检测限为 10  $\mu$ g/g 鲜重或 0.1  $\mu$ g/ mg prot**