海藻糖含量试剂盒（蒽酮比色法）说明书

（货号：ADS-W-TDX006　微板法 96 样 有效期：6 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。

本试剂盒用蒽酮-硫酸法测定海藻糖含量，利用糖类在较高温度下可被浓硫酸作用而脱水生成糠醛或羟甲基糖醛后，与蒽酮脱水缩合，形成糠醛的衍生物，呈蓝绿色。该物质在 620 nm 处有最大吸收，其颜色的深浅与糖含量成正比。

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
提取液	液体 120mL×2 瓶	4℃保存	
试剂一	粉体 3 瓶	4℃避光保存	每瓶： 1. 开盖前注意使粉体落入底部（可手动甩一甩）； 2. 每瓶加 11mL 的浓硫酸溶解备用； 3. 剩余试剂 4℃保存一周。
标准品	粉剂 1 支	4℃保存	1. 若重新做标曲，则用到该试剂； 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制； 3. 溶解后的标品一周内用完。

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、**浓硫酸**、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

四、海藻糖含量测定：

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：

称取约 0.1g 组织放入研钵中，加入 1mL 提取液进行研磨成匀浆，室温晃动提取 30min， 8000rpm 室温（25℃）离心 10min，取上清。

【注】：若增加样本量，可按照组织质量（g）：提取液体积(mL)为 1：5~10 的比例进行提取。

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 提取液；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 液体样本：

取 0.1mL 液体加入 1mL 提取液涡旋混匀，室温晃动提取 30min， 8000rpm 室温（25℃）离心 10min，取上清。

【注】：若增加样本量，可按照液体体积（mL）：提取液体积(mL)为 1：5~10 的比例提取。

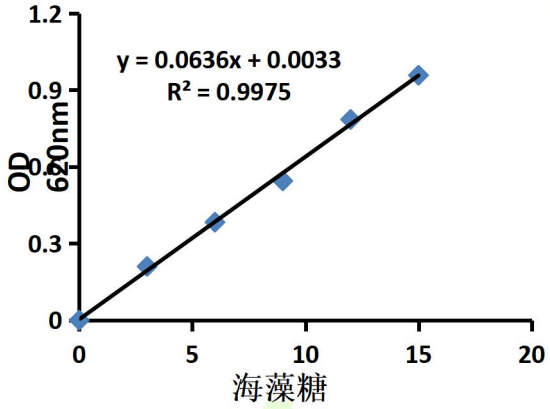
2、检测步骤：

① 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 620nm。
② 调节水浴锅至 95 度。
③ 先调2-3个样本做预测定，若吸光值A大于1.5，将样本用提取液稀释后（5-20倍）再测定，计算公式中乘以相应的稀释倍数D。
④ 在 EP 管中依次加入：

试剂组分（μL）	测定管	空白管
样本	150	
蒸馏水		150
试剂一	300	300
95-100℃沸水浴 3min，冷却后，**混匀**取 200μL 至 96 孔板中，于 620nm 处读取吸光值 A，ΔA=A 测定-A 空白。		

五、结果计算：

1、标准曲线方程为：y = 0.0636x + 0.0033；x 为标准品质量（μg），y 为吸光值 A。



2、按样本鲜重计算：
海藻糖含量(μg/g 鲜重)=[(ΔA-0.0033)÷0.0636]÷(W×V1÷V)×D=104.8×(ΔA-0.0033)÷W×D

3、按细菌或真菌密度计算：
海藻糖含量(μg/10^4cell)=[(ΔA-0.0033)÷0.0636]÷(500×V1÷V)×D=0.21×(ΔA-0.0033)×D

4、液体中海藻糖含量计算：
海藻糖含量(μg/mL)=[(ΔA-0.0033)÷0.0636]÷(V2×V1÷V)×D =1048×(ΔA-0.0033)×D

V---提取液总体积 1mL；　　V1---反应体系中样本体积，150μL=0.15mL；
V2---液体体积，0.1mL；　　W---样本质量，g；
D---稀释倍数，未稀释即为 1；　　500---细菌或真菌总数，500 万。

附：标准曲线制作过程：
1 制备标准品母液（1mg/mL）：向标准品 EP 管里面加入 2mL 提取液（母液需在两天内用且-20℃保存）。
2 把母液用提取液稀释成六个浓度梯度的标准品：0, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1.mg/mL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
3 依据测定管的加样表操作，根据结果即可制作标准曲线。