

海藻糖含量检测试剂盒说明书

Trehalose Content Assay Kit

分光光度法

货号: AK106

规格: 50T/48S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
提取液 ES16	50ml×1 瓶	4℃保存
AK106-A	粉剂×1 瓶	4℃保存

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介:

意义: 海藻糖 (Trehalose) 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。

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。

自备用品:

可见分光光度计、水浴锅、可调式移液器、1mL 玻璃比色皿、研钵、浓硫酸 (不允许快递) 和蒸馏水。

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 ES16 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 ES16), 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℃ 离心 10min, 取上清。
2. 组织的处理: 按照组织质量 (g): 提取液 ES16 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 ES16), 冰浴匀浆, 室温静置 45 min, 振荡 3~5 次, 冷却后, 8000g, 25℃ 离心 10min, 取上清。
3. 血清 (浆) 的处理: 按照血清 (浆) 体积 (mL): 提取液 ES16 体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例 (建议取 0.1mL 血清 (浆) 加入 1mL 提取液 ES16), 冰浴匀浆, 室温静置 45min, 振荡 3~5 次, 冷却后, 8000g, 25℃ 离心 10min, 取上清。

检测步骤:

1. 分光光度计预热 30min, 调节波长到 620 nm, 蒸馏水调零。
2. 调节水浴锅至 95 ℃。
3. 工作液的配制: 临用前在 AK106-A 中加入 7.5mL 蒸馏水后, 缓慢加入 42.5mL 浓硫酸, 不断搅拌, 充分溶解, 待用; 用不完的试剂 4℃ 保存一周。
4. 样本测定: 取 0.25mL 样本和 1mL 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, 在 620 nm 波长下记录测定吸光度值 A

注意:

1. 由于工作液具有强腐蚀性, 请谨慎操作。
2. 若吸光值大于 1, 请将样本用提取液 ES16 稀释后再测定, 计算公式中乘以相应的稀释倍数。
3. 最低检测限为 10 μ g/g 鲜重或 0.1 μ g/mg prot

计算公式:

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

1. 按样本鲜重计算:

$$\text{海藻糖含量 (mg/g 鲜重)} = [V1 \times (A - 0.0729) \div 8.8976] \div (W \times V1 \div V2) = 0.112 \times (A - 0.0729) \div W$$

2. 按样本蛋白浓度计算:

$$\text{海藻糖含量 (mg/mg prot)} = [V1 \times (A - 0.0729) \div 8.8976] \div (V1 \times Cpr) = 0.112 \times (A - 0.0729) \div Cpr$$

3. 按细菌或细胞密度计算:

$$\begin{aligned} \text{海藻糖含量 } (\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) &= [1000 \times V1 \times (A - 0.0729) \div 8.8976] \div (500 \times V1 \div V2) \\ &= 0.224 \times (A - 0.0729) \end{aligned}$$

4. 血清 (浆) 海藻糖含量计算

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

注: 1000: 1mg/mL=1000 μ g/mL; V1: 加入反应体系中样本体积, 0.25 mL; V2: 加入提取液 ES16 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