

海藻糖含量检测试剂盒说明书

Trehalose Content Assay Kit

微量法

货号: AK107

规格: 100T/96S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
提取液 ES16	100ml×1 瓶	4℃保存
AK107-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/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 (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. 分光光度计或酶标仪预热 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 AK107-A 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℃保存一周。
4. 样本测定: 取 60μL 样本和 240μL 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 200uL 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:

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 μg/g 鲜重或 0.1 μg/ mg prot

计算公式:

a. 使用微量石英比色皿测定的计算公式如下

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:

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

4. 血清(浆)海藻糖含量计算

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

1000: 1mg/mL=1000 μ g/mL; V1: 加入反应体系中样本体积, 60 μ L=0.06mL ; 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

b. 使用 96 孔板测定的计算公式如下

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。

1. 按样本鲜重计算:

$$\text{海藻糖含量(mg/g 鲜重)} = [V1 \times (A - 0.0729) \div 4.4488] \div (W \times V1 \div V2) = 0.224 \times (A - 0.0729) \div W$$

2. 按样本蛋白浓度计算:

$$\text{海藻糖含量(mg/mg prot)} = [V1 \times (A - 0.0729) \div 4.4488] \div (V1 \times Cpr) = 0.224 \times (A - 0.0729) \div Cpr$$

3. 按细菌或细胞密度计算:

$$\text{海藻糖含量} (\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) = [1000 \times V1 \times (A - 0.0729) \div 4.4488] \div (500 \times V1 \div V2) = 0.448 \times (A - 0.0729)$$

4. 血清(浆)海藻糖含量计算

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

注: 1000: 1mg/mL=1000 μ g/mL; V1: 加入反应体系中样本体积, 60 μ 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