

海藻糖酶 (Trehalase, THL) 试剂盒说明书

(货号: G0554F 分光法 24 样)

一、产品简介:

海藻糖酶 (EC 3.2.1.28) 广泛存在于细菌、霉菌和动植物中。能够专一性的水解海藻糖生成葡萄糖而直接用于能量供应。

海藻糖酶催化海藻糖生成葡萄糖, 葡萄糖在葡萄糖氧化酶的作用下与特异显色剂反应生成有色物质, 通过检测该有色物质的生成量, 即可得出海藻糖酶的活性大小。

二、测试盒组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 30mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	液体 10mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	粉剂 mg×1 瓶	4°C保存	临用前甩几下使粉剂落入底部, 再加入 3mL 蒸馏水溶解备用。
试剂三	粉剂 mg×1 瓶	-20°C保存	临用前甩几下使粉剂落入底部, 再加入 4.2mL 蒸馏水溶解备用。
试剂四	液体 26mL×1 瓶	4°C保存	
标准品	粉体 mg×1 支	4°C保存	若重新做标曲, 则用到该试剂

三、所需的仪器和用品:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm)、水浴锅、低温离心机、可调式移液器、研钵、冰。

四、海藻糖酶(THL)活性测定:

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:

称取约 0.1g 组织 (水分充足的样本可取 0.5g) 至研钵中, 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆。4°C×12000rpm 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【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); 4°C×12000rpm 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照数量 (10⁴ 个): 提取液体积 (mL) 为 500~1000: 1 比例进行提取。

③ 液体样本: 澄清的液体样本, 可直接检测。若浑浊, 离心后取上清检测。

2、上机检测:

① 可见分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 510nm, 蒸馏水调零。

② 所有试剂解冻至室温 (25°C)。

③ 煮沸样本: 上清液 (样本) 在 95-100°C 煮沸 5min 即可, 然后离心, 上清液备用。

④ 在 EP 管中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
样本	100	100 (煮沸样本)
试剂一	200	200
试剂二	50	50

30°C反应 1 小时后, 8000rpm 离心 10 分钟, 取上清液待测。

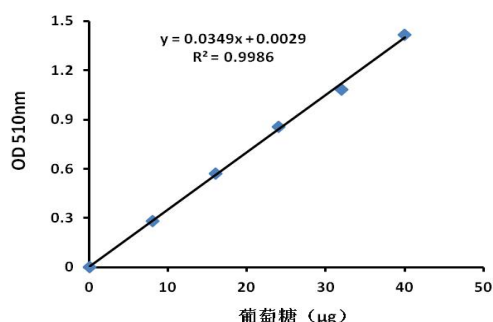
- ⑤ 显色反应, 在 1mL 玻璃比色皿依次加入 (或者在 EP 管中依次加入下列试剂, 反应完全后再取全部液体转移至比色皿中测定):

上清液	200	200
试剂三	80	80
试剂四	520	520
40°C反应 20min, 于 510nm 处读取吸光值 A, $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ 。		

- 【注】1. 若测定管 A 值大于 1.5, 可以对样本用蒸馏水进行稀释 (尤其是含糖量高的果实类样本), 或者对⑤步的上清液用蒸馏水进行稀释, 则稀释倍数 D 代入计算公式计算。
2. 若 ΔA 差值在零附近, 可增加④步中样本的体积 V1 (如增至 200 μ L, 则试剂一相应减少), 则改变后的 V1 需代入公式重新计算。

五、结果计算:

- 1、标准曲线方程为 $y = 0.0349x + 0.0029$; x 为标准品质量 (μ g), y 为 ΔA 。



- 2、按照蛋白浓度计算:

酶活定义: 每毫克组织蛋白在每小时催化产生 1 μ g 葡萄糖定义为一个酶活力单位。

$$\text{THL}(\mu\text{g/h/mg prot}) = [(\Delta A - 0.0029) \div 0.0349 \times (0.35 \div 0.2)] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T = 501.4 \times (\Delta A - 0.0029) \div \text{Cpr}$$

- 3、按样本鲜重计算:

酶活定义: 每克组织每小时催化产生 1 μ g 葡萄糖定义为一个酶活力单位。

$$\text{THL}(\mu\text{g/h/g 鲜重}) = [(\Delta A - 0.0029) \div 0.0349 \times (0.35 \div 0.2)] \div (W \times V1 \div V) \div T = 501.4 \times (\Delta A - 0.0029) \div W$$

- 4、按细菌或真菌密度计算:

酶活定义: 每 1 万个细菌或真菌每小时催化产生 1 μ g 葡萄糖定义为一个酶活力单位。

$$\text{THL}(\mu\text{g/h}/10^4\text{cell}) = [(\Delta A - 0.0029) \div 0.0349 \times (0.35 \div 0.2)] \div (500 \times V1 \div V) \div T = (\Delta A - 0.0029)$$

- 5、按液体体积计算:

酶活定义: 每毫升液体每小时催化产生 1 μ g 葡萄糖定义为一个酶活力单位。

$$\text{THL}(\mu\text{g/h/mL}) = [(\Delta A - 0.0029) \div 0.0349 \times (0.35 \div 0.2)] \div V1 \div T = 501.4 \times (\Delta A - 0.0029)$$

V--提取液体积, 1 mL; V1--样本体积: 0.1mL; W--样本质量, g; T--反应时间, 1 小时;
500--细菌或真菌数量, 500 万; 0.35--第④步反应的总体积; 0.2--第⑤步反应上清液体积;
Cpr--样本蛋白质浓度, mg/mL; 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。

附: 标准曲线制作过程:

- 1 制备标准品母液 (1mg/mL): 从标准品管中称量取出 2mg 至一新 EP 管中, 再加 2mL 蒸馏水混匀溶解即 1mg/mL 的葡萄糖 (母液需在两天内用且 -20°C 保存)。
- 2 把母液用蒸馏水稀释成以下浓度: 0, 0.04, 0.08, 0.12, 0.16, 0.2mg/mL。
- 3 于第⑤步显色反应阶段: 200 μ L 标准品 + 80 μ L 试剂三 + 520 μ L 试剂四, 40°C 反应 20min, 于 510nm 处读取吸光值 A, 依据结果即可制作标准曲线。