

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 煮沸样本的制备: 可取至少 300μL 待检测样本上清液于 95-100°C 煮沸 5min 后, 于室温或 4°C×12000rpm 离心 10min, 上清液即为对照管的待检液。

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）：

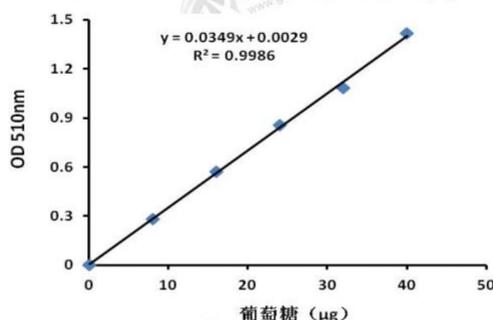
| | | |
|---|-----|-----|
| 上清液 | 200 | 200 |
| 试剂三 | 80 | 80 |
| 试剂四 | 520 | 520 |
| 40°C反应 20min，于 510nm 处读取吸光值 A， △A=A 测定-A 对照。 | | |

【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△A 小于 0.01，可增加④步中样本的体积 V1（如增至 200μL，则试剂一相应减少），或增加取样质量 W，则改变后的 V1 和 W 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（μg），y 为△A。



- 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 1μg 葡萄糖定义为一个酶活力单位。

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

- 3、按样本鲜重计算：

酶活定义：每克组织每小时催化产生 1μg 葡萄糖定义为一个酶活力单位。

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

- 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 1μg 葡萄糖定义为一个酶活力单位。

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

- 5、按液体体积计算：

酶活定义：每毫升液体每小时催化产生 1μg 葡萄糖定义为一个酶活力单位。

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

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，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：200μL 标准品+80μL 试剂三+520μL 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。