

Trehalase Activity Kit

海藻糖酶 (THL) 试剂盒说明书

货号: G0554F | 方法: 可见分光法 | 规格: 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、试剂盒组成和配制:

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。		

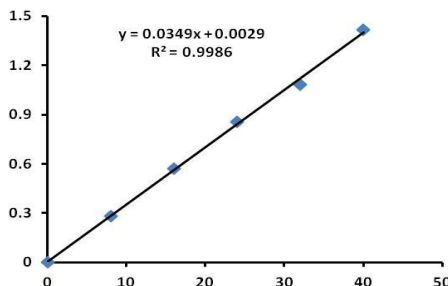
- ⑤ 显色反应, 在 1mL 玻璃比色皿依次加入 (或者在 EP 管中依次加入下列试剂, 反应完全后再取全部液体转移至比色皿中测定):

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, $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$		

注意: 本操作流程适用于绝大多数常规样本检测, 实验条件可根据实际样本状态适度微调; 针对特殊类型样本, 我司技术支持可提供专属优化建议。

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 ΔA 。



标准曲线示意图

说明: 标准曲线由标准品测定获得, 具体制作方法详见随货说明书或咨询技术支持。

- 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 $1\mu\text{g}$ 葡萄糖定义为一个酶活力单位。

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

- 3、按样本鲜重计算:

酶活定义: 每克组织每小时催化产生 $1\mu\text{g}$ 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 $1\mu\text{g}$ 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 $1\mu\text{g}$ 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, 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。