

海藻糖酶 (Trehalase, THL) 试剂盒说明书

(微板法 48 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 60mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	液体 20mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂二	粉剂 mg×1 瓶	4℃ 保存	临用前甩几下使粉剂落入底部, 再加入 6mL 蒸馏水溶解备用。
试剂三	粉剂 mg×1 支	-20℃ 保存	临用前甩几下使粉剂落入底部, 再加入 2.1mL 蒸馏水溶解备用。
试剂四	液体 14mL×1 瓶	4℃ 保存	
标准品	液体 mL×1 支	4℃ 保存	若重新做标曲, 则用到该试剂

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、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℃×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℃×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 的比例进行提取

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 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 510nm。

② 所有试剂解冻至室温 (25℃)。

③ 煮沸样本: 上清液 (样本) 在 95-100℃ 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℃反应 1 小时后，8000rpm 离心 10 分钟，取上清液待测。

⑤ 显色反应，在 96 孔板中依次加入：

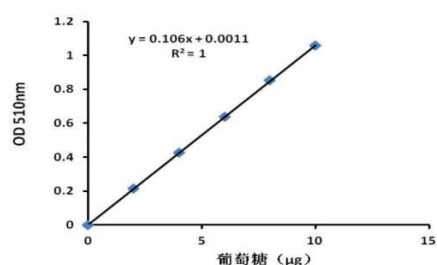
上清液	50	50
试剂三	20	20
试剂四	130	130
40℃反应 20min，于 510nm 处读取吸光值 A， ΔA=A 测定-A 对照。		

【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ΔA 差值在零附近，可增加④步中样本的体积 V1（如增至 200μL，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 $y = 0.106x + 0.0011$ ；x 为标准品质量（μg），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 1μg 葡萄糖定义为一个酶活力单位。

$$\text{THL 活性}(\mu\text{g}/\text{h}/\text{mg prot}) = [(\Delta A - 0.0011) \div 0.106 \times (0.35 \div 0.05)] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T$$
$$= 660.4 \times (\Delta A - 0.0011) \div \text{Cpr}$$

3、按样本鲜重计算

酶活定义：每克组织每小时催化产生 1μg 葡萄糖定义为一个酶活力单位。

$$\text{THL 活性}(\mu\text{g}/\text{h}/\text{g 鲜重}) = [(\Delta A - 0.0011) \div 0.106 \times (0.35 \div 0.05)] \div (W \times V1 \div V) \div T$$
$$= 660.4 \times (\Delta A - 0.0011) \div W。$$

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。

$$\text{THL 活力}(\mu\text{g}/\text{h}/10^4\text{cell}) = [(\Delta A - 0.0011) \div 0.106 \times (0.35 \div 0.05)] \div (500 \times V1 \div V) \div T$$
$$= 1.321 \times (\Delta A - 0.0011)$$

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。

$$\text{THL 活力}(\mu\text{g}/\text{h}/\text{mL}) = [(\Delta A - 0.0011) \div 0.106 \times (0.35 \div 0.05)] \div V1 \div T = 660.4 \times (\Delta A - 0.0011)$$

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；0.05--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 标准品母液（1mg/mL）。

2 把母液稀释成以下浓度：0, 0.04, 0.08, 0.12, 0.16, 0.2mg/mL。也可根据实际来调整浓度。

3 于第⑤步显色反应阶段：50μL 标准品+20μL 试剂三+130μL 试剂四，40℃反应 20min，于 510nm 处读取吸光值 A，依据结果即可制作标准曲线。