

海藻糖酶（Trehalase, THL）试剂盒说明书

（货号：G0554W 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	粉体 mg×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:

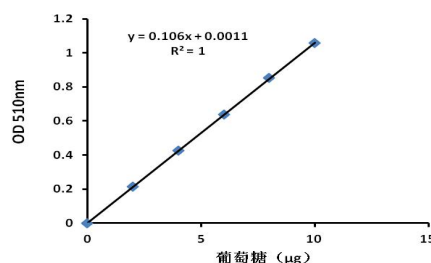
上清液	50	50
试剂三	20	20
试剂四	130	130
40℃反应 20min, 于 510nm 处读取吸光值 A, $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$		

【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 $y = 0.106x + 0.0011$; 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。

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

3、按样本鲜重计算:

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

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

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 1 μ g 葡萄糖定义为一个酶活力单位。

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

5、按液体体积计算:

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

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

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 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℃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: 50 μ L 标准品+20 μ L 试剂三+130 μ L 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。