

海藻糖酶 (Trehalase, THL) 试剂盒说明书

(货号: BP10332W 微板法 48 样 有效期: 3 个月)

一、指标介绍:

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:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 60mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 25mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉剂 1 瓶	4℃保存	1. 开盖前注意使粉剂落入底部 (可手动甩一甩); 2. 加入 6mL 蒸馏水溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂三	粉剂 1 瓶	-20℃避光保存	1. 开盖前注意使粉剂落入底部 (可手动甩一甩); 2. 加入 2.1mL 蒸馏水溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂四	液体 15mL×1 瓶	4℃避光保存	
标准品	粉体 1 支	4℃保存	1. 若重新做标曲, 则用到该试剂; 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制; 3. 溶解后的标品一周内用完。

三、实验器材:

研钵 (匀浆机)、冰盒 (制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅 (烘箱、培养箱、金属浴)、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本 (例如不同类型或分组) 进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

1、样本提取:

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、检测步骤：

- 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：

试剂组分（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：

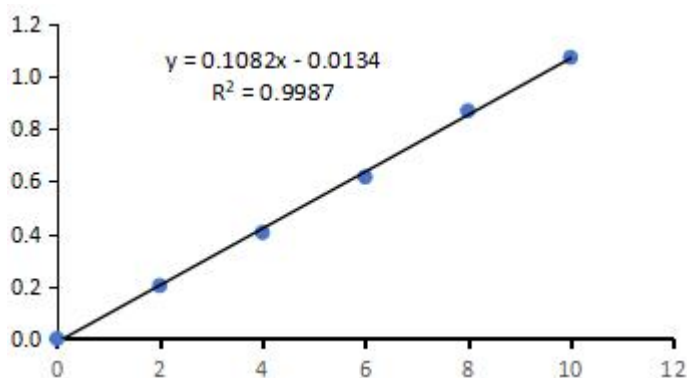
上清液	50	50
试剂三	20	20
试剂四	130	130
40℃反应 20min，于 510nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ 。		

【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 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 $y = 0.1082x - 0.0134$ ；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。

$$\text{THL} (\mu\text{g/h/mg prot}) = [(\Delta A + 0.0134) \div 0.1082 \times (0.35 \div 0.05)] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T = 647 \times (\Delta A + 0.0134) \div \text{Cpr}$$

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。

$$\text{THL} (\mu\text{g/h/g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0134) \div 0.1082 \times (0.35 \div 0.05)] \div (W \times V1 \div V) \div T = 647 \times (\Delta A + 0.0134) \div W$$

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。

$$\text{THL} (\mu\text{g/h}/10^4 \text{cell}) = [(\Delta A + 0.0134) \div 0.1082 \times (0.35 \div 0.05)] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 1.294 \times (\Delta A + 0.0134)$$

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。

$$\text{THL } (\mu\text{g/h/mL}) = [(\Delta A + 0.0134) \div 0.1082 \times (0.35 \div 0.05)] \div V1 \div T = 647 \times (\Delta A + 0.0134)$$

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 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）。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0, 0.04, 0.08, 0.12, 0.16, 0.2mg/mL。也可根据实际样本调整标准品浓度。
- 2 标品稀释参照表如下：

吸取标准品母液 200uL，加入 800uL 蒸馏水，混匀得到 0.2mg/mL 的标品稀释液待用。						
标品浓度 mg/mL	0	0.04	0.08	0.12	0.16	0.2
标品稀释液 uL	0	40	80	120	160	200
水 uL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

- 3 依据加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。

试剂名称 (μL)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	50	
蒸馏水		50
试剂三	20	20
试剂四	130	130
混匀，40℃ 反应 20min，于 510nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A$ 测定-0 浓度管。		