



海藻糖酶测定试剂盒说明书

(货号 A150-1-1 Trehalase, THL; 分光光度法 50T/24 样)

一、测定意义:

THL广泛存在于动物、植物、微生物和培养细胞中。海藻糖酶主要功能在于生物体分解海藻糖生成葡萄糖而直接用于能量供应。

二、测定原理:

THL 催化海藻糖产生葡萄糖, 经葡萄糖氧化酶作用生成葡萄糖酸和过氧化氢, 过氧化物酶催化过氧化氢跟 4-氨基安替比林偶联酚反应生成显色物, 在 505nm 处测定其吸光度值, 反映 THL 的酶活性。

三、需自备的仪器和用品:

可见分光光度计、水浴锅、可调式移液器、1mL玻璃比色皿、研钵、冰和蒸馏水。

四、试剂的组成和配制:

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: 液体25mL×1瓶, 4°C保存;

试剂三: 液体25mL×1瓶, 4°C保存。如果出现结冰现象可以37温浴溶解后使用。

工作液: 试剂二和试剂三等比例混合, 需要多少配多少, 现配现用。

五、测定步骤:

1、样本前处理:

(1) 细菌或细胞样本:

收集细菌或细胞到离心管中, 离心后弃上清; 按照细菌或细胞数量(万)和提取液体积(mL) 500-1000:1的比例(建议500万中加入1mL提取液), 超声破碎(冰浴, 功率20%或200W, 超声3s, 间隔10s, 重复30次)后, 8000g, 4°C下离心10min, 取上清放置在冰上待测。

(2) 组织样本:

按照组织质量(g)和提取液体积(mL) 1:5-10的比例(建议称取0.1g组织加入1mL提取液), 冰浴中匀浆。8000g, 4°C离心10min后取上清放置在冰上待测。

(3) 血清(浆)样本:

按照血清(浆)和提取液比例 1:5-10 的比例(建议0.1mL血清加入1mL提取液), 冰浴中匀浆后 8000g, 4°C离心10min取上清放置在冰上待测。

2、检测步骤:

	测定管	对照管
样本上清(μL)	90	90
试剂一(μL)	150	
蒸馏水(μL)		150
45°C水浴, 准确反应15min, 95°C水浴5分钟终止反应, 10000g离心10分钟取上清		
上清(μL)	100	100
工作液(μL)	900	900
混匀, 37°C恒温水浴15min, 505nm波长读取吸光度值A, 计算 $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ (每个测定管需设一个对照管)		

六、THL 活性计算:

标准条件下测定的回归方程为 $y = 0.4858x - 0.0042$; x 为标准品浓度(mg/mL), y 为吸光值变化。

1. 按照蛋白浓度计算:

单位定义: 每 mg 组织蛋白每分钟催化产生 1nmol 葡萄糖定义为一个酶活性单位

$$\begin{aligned} \text{THL活力} &= \frac{(\Delta A + 0.0042) \times V_{\text{反总}} \times 1000}{0.4858 \times V_{\text{样}} \times \text{Cpr} \times T} \\ (\text{U/mgprot}) &= \frac{366 \times (\Delta A + 0.0042)}{\text{Cpr}} \end{aligned}$$

2. 按照样本鲜重计算:

单位定义: 每 g 组织样本每分钟催化产生 1nmol 葡萄糖定义为一个酶活性单位

$$\begin{aligned} \text{THL活力} &= \frac{(\Delta A + 0.0042) \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{样总}} \times 1000}{0.4858 \times W \times V_{\text{样}} \times T} \\ (\text{U/g鲜重}) &= \frac{366 \times (\Delta A + 0.0042)}{W} \end{aligned}$$

3. 按照细菌或细胞密度计算

单位定义: 每一万个细菌或细胞每分钟催化产生 1nmol 葡萄糖定义为一个酶活性单位

$$\begin{aligned} \text{THL活力} &= \frac{(\Delta A + 0.0042) \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{样总}} \times 1000}{0.4858 \times 500 \times V_{\text{样}} \times T} \\ (\text{U}/10^4 \text{cell}) &= 0.732 \times (\Delta A + 0.0042) \end{aligned}$$

4. 按照血清(浆)体积计算

单位定义: 每 mL 血清(浆)每分钟催化产生 1nmol 葡萄糖定义为一个酶活性单位

$$\begin{aligned} \text{THL活力} &= \frac{(\Delta A + 0.0042) \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{样总}} \times 1000}{0.4858 \times V_{\text{液}} \times V_{\text{样}} \times T} \\ (\text{U/mL}) &= 3660 \times (\Delta A + 0.0042) \end{aligned}$$

Cpr 是样本匀浆中蛋白质浓度, 单位 mg/mL;

$V_{\text{液}}$ 是血清浆体积, 为 0.1mL;

$V_{\text{样}}$ 是样本体积, 推荐 0.09mL;

$V_{\text{样总}}$ 是加入提取液体积, 1ml;

$V_{\text{反总}}$ 是反应液总体积, 0.24ml;

W 是组织样本鲜重, g;

500 是细胞或细菌总数, 以万为单位, 数量 500(万);

T 为反应时间 10min。