

上海茁彩生物科技有限公司  
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0700

Size: 50T/24S

## 海藻糖酶检测试剂盒说明书

### 分光光度法

\*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

#### 一、测定意义：

THL (EC 3. 2. 1. 28) 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：

采用 3,5-二硝基水杨酸法测定 THL 催化海藻糖产生的还原糖的含量。还原糖与 3,5-二硝基水杨酸共热生成棕红色的氨基化合物，在一定范围内还原糖的量和反应液的颜色深度成正比，由此判断 THL 活性的高低。

#### 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、试剂的组成和配置：

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液	液体 50mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂一	液体 30mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂二	粉剂×1 瓶	4°C 保存	用时加入 2.5mL 试剂一，充分溶解，现配先用；
试剂三	液体 30mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂四	液体 30mL×1 瓶	常温保存	-
标准品	粉剂×1 支	4°C 保存	含 10mg 无水葡萄糖（干燥失重<0.2%）临用前加入 1 蒸馏水溶解备用，4°C 可保存 1 周，或者用饱和苯甲酸溶液溶解，可保存更长时间。
标准品准备：将标准品用蒸馏水稀释至 1、0.8、0.6、0.4、0.2mg/ml。			

#### 五、操作步骤：

##### 1. 样品测定的准备：

- (1) 细菌或细胞：收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；按照每 400 万细菌或细胞加入 1mL 提取液充分匀浆以破碎并裂解细胞（功率 20%，超声 3S 秒，间隔 10S，重复 30 次）8000g，4°C 离心 10min，取上清，置冰上待测。
- (2) 组织：称取约 0.1g 组织加入 1mL 提取液，冰浴中匀浆。8000g，4°C 下离心 10min，取上清，置冰上待测。

2. 加样表和测定步骤（在1.5mLEP 管中依次加入下列试剂）

试剂名称 (μL)	对照管	测定管	标准管
样本	180	180	-
标准液	-		180
试剂一	300	220	300
试剂二	-	80	-
37°C（哺乳动物）或 25°C（其它物种）水浴，准确反应时间 10min			
试剂三	400	400	400
试剂四	400	400	400

混匀，100°C煮沸 5min（盖紧，以防止水分散失），冷却后，测定540nm 处测定管吸光值。计算  $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ 。每个测定管均需设立一个对照管。根据标准管浓度和吸光度建立标准曲线，x 为吸光度，y 为标准品浓度（mg/mL）

## 六、THL 活力计算：

根据标准曲线计算样品中产生的还原糖量，即将  $\Delta A$ （A 测定管-A 对照管）带入 x 计算出 y 值。

### 1、按照蛋白浓度计算

单位的定义：每 mg 组织蛋白在反应体系中每分钟催化产生 1 μg 葡萄糖定义为一个酶活力单位。

$$\text{THL 活力 (U /mg prot)} = 1000 \times y \div T \div C_{\text{pr}} = 100 \times y \div C_{\text{pr}}$$

### 2、按样本鲜重计算

单位的定义：每 g 组织在反应体系中每分钟催化产生 1 μg 葡萄糖定义为一个酶活力单位。

$$\text{THL 活力 (U /g 鲜重)} = 1000 \times y \div T \div (W \div V_{\text{样总}}) = 100 \times y \div W$$

### 3、按细菌或细胞密度计算

单位的定义：每 1 万个细菌或细胞在反应体系中每分钟催化产生 1  $\mu\text{g}$  葡萄糖定义为一个酶活力单位。

$$\text{THL 活力 (U / } 10^4 \text{ cell)} = 1000 \times y \div T \div (500 \div V \text{ 样总}) = 0.2 \times y$$

1000: 1mg/mL=1000 $\mu\text{g}$ /mL; T: 反应时间, 10min; V 样总: 加入提取液体积, 1 mL;

Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样品质量, g; 500: 细菌或细胞总数, 500 万。