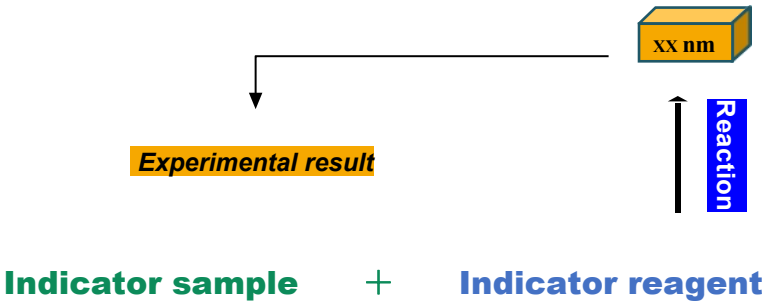
上海茁彩生物科技有限公司

Shanghai zcibio technology Co.,Ltd.



生化检测原理示意图

货号：ZC-S0422 规格：100管/48样

海藻糖酶（Trehalase，THL）试剂盒说明书
微量法

正式测定前务必取2-3个预期差异较大的样本做预测定

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。

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。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计/酶标仪、水浴锅、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔板、研钵、冰和蒸馏水。

试剂的组成和配制：

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液	液体 100mL×1 瓶	4℃保存	-
试剂一	液体 7mL×1 瓶	4℃保存	-
试剂二	粉剂×1 支	4℃保存	用时加入1mL试剂一，充分溶解待用；用不完的试剂 4℃保存；
试剂三	液体 10mL×1 瓶	4℃保存	-
试剂四	液体 10mL×1 瓶	常温保存	-

样品测定的准备：

1、细菌或细胞的处理：收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；按照细菌或细胞数量（10^4个）：提取液体积（mL）为500~1000：1的比例（建议500万细菌或细胞加入1mL提取液），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）；8000g，4℃离心10min，取上清，置冰上待测。

2、组织的处理：按照组织质量（g）：提取液体积(mL)为1：5~10的比例（建议称取约0.1g 组织，加入1mL 提取液），冰浴中匀浆。8000g ，4℃离心10min，取上清，置冰上待测。

3、血清（浆）的处理：按照血清（浆）体积（mL）：提取液体积(mL)为1：5~10的比例（建议取0.1mL 血清（浆）加入1mL 提取液），冰浴中匀浆。8000g ，4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

测定步骤

1、分光光度计或酶标仪预热30min以上，调节波长至550nm，蒸馏水调零。

2、调节水浴锅至95度。

3、加样表（在EP管中依次加入下列试剂）：

试剂名称（μL）	对照管	测定管
样本	40	40
试剂一	70	50
试剂二		20
37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）水浴，准确反应 10min		
试剂三	95	95
试剂四	95	95

混匀，95℃水浴 5min（盖紧，以防止水分散失），冷却后，取 200μL 至微量石英比色皿或 96 孔板中分别测定 550nm处测定管和对照管吸光值。计算 ΔA=A 测定管-A 对照管。每个测定管需设一个对照管。

THL 活力计算：

a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

1、标准条件下测定回归方程为y=1.311x - 0.6264；x为标准品浓度（mg/mL），y为吸光值。

2、按照蛋白浓度计算

单位的定义：每mg组织蛋白每分钟催化产生1μg葡萄糖定义为一个酶活力单位。

THL 活力(μg/min/mg prot)=[1000×(ΔA+0.6264) ÷1.311×V1]÷(V1×Cpr)÷T

=76× (ΔA+0.6264)÷Cpr。

3、按样本鲜重计算

单位的定义：每g组织每分钟催化产生1μg葡萄糖定义为一个酶活力单位。

THL 活力(μg/min/g 鲜重)=[1000×(ΔA+0.6264) ÷1.311×V1]÷(W ×V1÷V2)÷T

=76×(ΔA+0.6264)÷W。

4、按细菌或细胞密度计算

单位的定义：每1万个细菌或细胞每分钟催化产生1μg葡萄糖定义为一个酶活力单位。

THL 活力(μg/min/10^4cell)=[1000×(ΔA+0.6264)÷1.311×V1]÷(500×V1÷V2)÷T =0.152×(ΔA+0.6264)

5、按血清（浆）体积计算

单位的定义：每mL血清（浆）每分钟催化产生1μg葡萄糖定义为一个酶活力单位。

THL 活力(μg/min/mL)= [1000×(ΔA+0.6264) ÷1.311×V1]÷(V3×V1÷V2) ÷T

=760×(ΔA+0.6264)。

1000：1mg/mL=1000μg/mL； V1：加入样本体积：0.04mL；V2：加入提取液体积，1 mL；V3：加入血清（浆）体积，0.1mL；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；500：细菌或细胞总数，500万；T：反应时间，10min；

b. 用96 孔板测定的计算公式如下

1、标准条件下测定回归方程为y =0.6555x-0.6264；x为标准品浓度（mg/mL），y为吸光值。

2、按照蛋白浓度计算

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

THL 活力(μg/min/mg prot)=[1000×(ΔA+0.6264)÷0.6555×V1]÷(V1×Cpr)÷T

=152×(ΔA+0.6264)÷Cpr。

3、按样本鲜重计算

单位的定义：每g组织每分钟催化产生1μg葡萄糖定义为一个酶活力单位。

THL 活力(μg/min/g 鲜重)= [1000×(ΔA+0.6264) ÷0.6555×V1]÷(W ×V1÷V2) ÷T
=152×(ΔA+0.6264)÷W。

4、按细菌或细胞密度计算

单位的定义：每1万个细菌或细胞每分钟催化产生1μg葡萄糖定义为一个酶活力单位。

THL 活力(μg/min/10^4cell)=[1000×(ΔA+0.6264) ÷0.6555×V1]÷(500×V1÷V2) ÷T
=0.304×(ΔA+0.6264)

5、按血清（浆）体积计算

单位的定义：每mL血清（浆）每分钟催化产生1μg葡萄糖定义为一个酶活力单位。

THL 活力(μg/min/mL)=[1000×(ΔA+0.6264) ÷0.6555×V1]÷(V3×V1÷V2)÷T
=1520×(ΔA+0.6264)。

1000：1mg/mL=1000μg/mL； V1：加入样本体积：0.04mL；V2：加入提取液体积，1 mL；V3：加入血清（浆）体积，0.1mL；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；500：细菌或细胞总数，500 万；T：反应时间，10min；