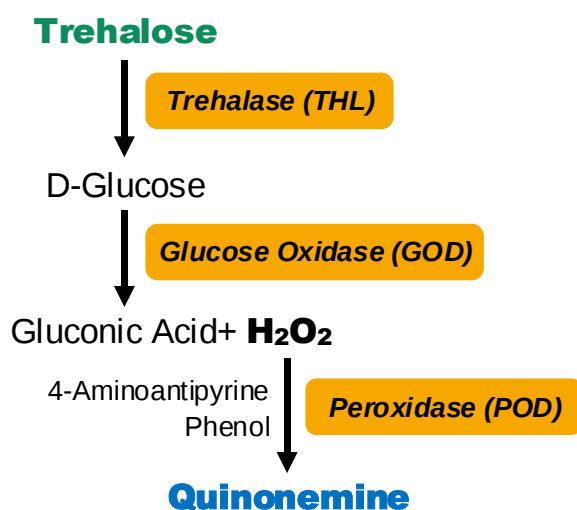




海藻糖酶 (THL) 活性检测试剂盒

Trehalase (THL) Activity Assay Kit



北京盒子生工科技有限公司
Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.



海藻糖酶（THL）活性检测试剂盒

Trehalase (THL) Activity Assay Kit

一、产品描述

海藻糖酶广泛存在于微生物、昆虫、植物和无脊椎动物中,作为海藻糖代谢过程中的重要水解酶,能够特异性地将海藻糖水解为葡萄糖,在葡萄糖转运、能量贮存和抗逆方面具有重要作用。

海藻糖酶能够催化海藻糖生成葡萄糖,葡萄糖氧化酶(Glucose Oxidase, GOD)催化葡萄糖氧化为葡萄糖酸,并释放 H_2O_2 ; 过氧化物酶(Peroxidase, POD)催化 H_2O_2 氧化 4-氨基安替比林偶联酚,生成红色醌类化合物,产物在 505 nm 处具有特征吸收峰,通过吸光值变化即可表征海藻糖酶的活性。

二、产品内容

名称	试剂规格	储存条件	使用说明及注意事项
提取液	液体 30 mL×1 瓶	4°C保存	-
试剂一	粉剂×1 瓶	4°C保存	使用前加入 5 mL 试剂二充分溶解 (现用现配)
试剂二	液体 10 mL×1 瓶	4°C保存	-
试剂三	液体 35 mL×1 瓶	4°C保存	-
试剂四	液体 35 mL×1 瓶	4°C避光保存	-
标准液	液体 1 mL×1 支	4°C保存	10 mg/mL 葡萄糖标准液
标准稀释液的制备: 将 10 mg/mL 葡萄糖标准液使用蒸馏水稀释至 0.4、0.3、0.2、0.1、0.05、0.025 mg/mL 即为标准稀释液。			

序号	A	1	2	3	4	5	6
稀释前浓度 (mg/mL)	10	1.0	1.0	1.0	1.0	0.1	0.05
标准液体积 (μL)	100	200	150	100	50	200	200
蒸馏水体积 (μL)	900	300	350	400	450	200	200
稀释后浓度 (mg/mL)	1.0	0.4	0.3	0.2	0.1	0.05	0.025

三、产品使用说明

测定过程中所需要的仪器和试剂: 可见分光光度计、1 mL 玻璃比色皿 (光径 10 mm)、研钵/匀浆器、可调式移液器、台式离心机、恒温水浴/培养箱和蒸馏水。

1.粗酶液制备（可根据预实验结果适当调整样本量及比例）

①组织：按照组织质量（g）：提取液体积（mL）为 1:（5-10）的比例（建议称取 0.1 g 组织，加入 1 mL 提取液）处理样品，冰浴匀浆，4℃ 8000 g 离心 10 min，取上清液置于冰上待测。

②细菌或细胞：离心收集细菌或细胞至离心管内，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 1 mL 蒸馏水）处理样品，冰浴超声破碎（功率 20%或 200 W，超声 3 s，间隔 10 s，重复 30 次），4℃ 8000 g 离心 10 min，取上清置于冰上待测。

③血清（浆）、培养液等液体样本：吸取 100 μ L 液体样本，加入 900 μ L 提取液，充分混匀，4℃ 8000 g 离心 10 min，取上清液置于冰上待测。

2.测定步骤

①分光光度计预热 30 min 以上，调节波长至 505 nm，蒸馏水调零。

②THL 工作液的制备（现用现配）：根据使用量按照试剂三：试剂四 = 1:1 的体积比配置。

③在离心管中依次加入下列试剂：

试剂	测定管 (μ L)	对照管 (μ L)	标准管 (μ L)	空白管 (μ L)
粗酶液	90	90	-	-
试剂一	150	-	-	-
试剂二	-	150	-	-
①充分混匀，45℃准确反应 15 min				
②立即 95℃水浴处理 5 min，冷却至室温				
③4℃ 12000 g 离心 10 min，取上清				
上清液	100	100	-	-
标准稀释液	-	-	100	-
蒸馏水	-	-	-	100
THL 工作液	900	900	900	900
充分混匀，37℃显色 15 min				

吸光值测定：将反应液置于 1 mL 玻璃比色皿中，测定 505 nm 处吸光值，记为 A 测定、A 对照、A 标准和 A 空白；计算 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$ 。注：空白管只需测定 1-2 次，每个样品均需设一个对照管。

标准曲线的建立：以 0.4、0.3、0.2、0.1、0.05、0.025 mg/mL 为横坐标（x），以其对应的 ΔA 标准为纵坐标（y），绘制标准曲线，得到标准方程 $y=kx+b$ ，将 $\Delta A_{\text{测定}}$ 带入公式中得到 x（mg/mL）。

3.海藻糖酶（THL）活性计算

①按组织蛋白浓度计算

单位定义：每 mg 组织蛋白在反应体系中每分钟生成 1 μg 葡萄糖定义为一个酶活力单位。

$$\text{THL (U/mg prot)} = \frac{1000 \times x \times V_{\text{酶促}}}{\text{Cpr} \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{177.78 \times x}{\text{Cpr}}$$

②按组织样本质量计算

单位定义：每 g 组织在反应体系中每分钟生成 1 μg 葡萄糖定义为一个酶活力单位。

$$\text{THL (U/g)} = \frac{1000 \times x \times V_{\text{提}} \times V_{\text{酶促}}}{W \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{177.78 \times x}{W}$$

③按细菌或细胞数量计算

单位定义：每 10⁴ 个细菌或细胞在反应体系中每分钟生成 1 μg 葡萄糖定义为一个酶活力单位。

$$\text{THL (U/10}^4 \text{ cell)} = \frac{1000 \times x \times V_{\text{提}} \times V_{\text{酶促}}}{\text{细菌或细胞数量} \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{177.78 \times x}{\text{细菌或细胞数量}}$$

④按液体样本体积计算

单位定义：每 mL 液体样本在反应体系中每分钟生成 1 μg 葡萄糖定义为一个酶活力单位。

$$\text{THL (U/mL)} = \frac{1000 \times x \times V_{\text{提}} \times V_{\text{酶促}}}{V_{\text{样}} \times V_{\text{液}} \times T} = 1777.78 \times x$$

注释： V 样：反应体系中加入粗酶液的体积，0.09 mL；V 酶促：酶促反应总体积，0.24 mL；V 提：粗酶液总体积，1 mL；V 液：提取过程中加入液体样本的体积，0.1 mL；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；W：样本质量，g；细菌或细胞数量：以万计；T：反应时间，15 min；1000：单位换算系数，1 mg/mL=1000 μg/mL。

四、注意事项

①若测定吸光值超出标准吸光值线性范围：高于最高值建议将上清液适当稀释后再进行测定，低于最低值建议适当增加样本量重新制备粗酶液后再进行测定，计算时相应修改；

②为保证结果准确且避免试剂损失，测定前请仔细阅读说明书（以实际收到说明书内容为准），确认试剂储存和准备是否充分，操作步骤是否清楚，且务必取 2-3 个预期差异较大的样本进行预测定，过程中问题请您及时与工作人员联系。

For Research Use Only. Not for Use in Diagnostic Procedures.

