

海藻糖酶 (Trehalase, THL) 试剂盒说明书

分光光度法 50 管/24 样

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:

THL 催化海藻糖产生葡萄糖, 葡萄糖氧化酶催化葡萄糖氧化成葡萄糖酸, 并产生过氧化氢; 过氧化物酶催化过氧化氢氧化 4-氨基安替比林偶联酚, 生成有色化合物, 在 505 nm 有特征吸收峰, 以此反映 THL 活性。

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。

试剂的组成和配制:

提取液: 液体 25mL×1 瓶, 4℃ 保存;

试剂一: 液体 10mL×1 瓶, 4℃ 保存;

试剂二: 液体 25ml×1 瓶, 4℃ 保存;

试剂三: 液体 25ml×1 瓶, 4℃ 保存; (若出现结冰现象, 可 37℃ 水浴溶解后使用)

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

2、调节水浴锅至 95 度。

3、工作液的配制: 使用前将试剂二和试剂三 1:1 等体积混合, 用多少配多少。

4、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	90	90
蒸馏水	150	
试剂一		150

45℃ 水浴, 准确反应 15min, 95℃ 水浴 5 分钟终止反应, 得混合液 (若出现沉淀可 10000g 4℃ 离心 10min 后取上清)。

混合液	100	100
工作液	900	900

混匀，置 37°C（哺乳动物）或 25°C（其它物种）保温 15min 后，于 505nm 波长处读取吸光度。计算 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ 。每个测定管需设一个对照管。

THL 活力计算：

1、标准条件下测定回归方程为 $y = 0.4858x - 0.0042$, $R^2 = 0.9999$; x 为标准品浓度 ($\mu\text{mol/mL}$), 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 1nmol 葡萄糖定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{THL 活力}(\text{nmol/min/mg prot}) &= (\Delta A + 0.0042) \div 0.4858 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \times 1000 \\ &= 366 \times (\Delta A + 0.0042) \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

3、按样本鲜重计算

单位的定义：每 g 组织每分钟催化产生 1nmol 葡萄糖定义为一个酶活力单位。

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

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 1nmol 葡萄糖定义为一个酶活力单位。

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

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 1nmol 葡萄糖定义为一个酶活力单位。

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

$V_{\text{样}}$ ：加入样本体积，0.09mL； $V_{\text{样总}}$ ：加入提取液体积，1 mL； $V_{\text{反总}}$ ：反应体系总体积，0.24mL； $V_{\text{液}}$ ：加入血清（浆）体积，0.1mL； C_{pr} ：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，15min；