

海藻糖酶 (Trehalase, THL) 试剂盒说明书

微量法 100管/48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/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：

提取液：液体60mL×1瓶，4℃保存；

试剂一：液体6mL×1瓶，4℃保存；

试剂二：液体 10ml×1瓶，4℃保存；

试剂三：液体 10ml×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（10⁴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：

试剂名称 (μL)	对照管	测定管
样本	30	30
蒸馏水	50	

试剂一		50
-----	--	----

45°C水浴，准确反应15min，95°C水浴5分钟终止反应，得混合液(若出现沉淀可10000g

4°C离心10min后取上清)。

混合液	20	20
工作液	180	180

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：

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 $y = 0.4858x - 0.0042$ ， $R^2 = 0.9999$ ； 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。

$$\begin{aligned} \text{THL活力}(\text{nmol/min/104 cell}) &= (\Delta A + 0.0042) \div 0.4858 \times V_{\text{反总}} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \times 1000 \\ &= 0.732 \times (\Delta A + 0.0042) \end{aligned}$$

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，0.03mL； $V_{\text{样总}}$ ：加入提取液体积，1 mL； $V_{\text{反总}}$ ：反应体系总体积，0.08mL； $V_{\text{液}}$ ：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；

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 $y = 0.2429x - 0.0042$ ， $R^2 = 0.9999$ ； 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。

$$\begin{aligned}\text{THL活力}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) &= (\Delta A + 0.0042) \div 0.2429 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \times 1000 \\ &= 732 \times (\Delta A + 0.0042) \div C_{\text{pr}}\end{aligned}$$

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。

$$\begin{aligned}\text{THL活力}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= (\Delta A + 0.0042) \div 0.2429 \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \times 1000 \\ &= 732 \times (\Delta A + 0.0042) \div W\end{aligned}$$

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。

$$\begin{aligned}\text{THL活力}(\text{nmol}/\text{min}/104 \text{ cell}) &= (\Delta A + 0.0042) \div 0.2429 \times V_{\text{反总}} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \times 1000 \\ &= 1.464 \times (\Delta A + 0.0042)\end{aligned}$$

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。

$$\begin{aligned}\text{THL活力}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}) &= (\Delta A + 0.0042) \div 0.2429 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{液}} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \times 1000 \\ &= 7320 \times (\Delta A + 0.0042)\end{aligned}$$

V样：加入样本体积：0.03mL； V样总：加入提取液体积，1 mL； V反总：反应体系总体积，0.08mL； V液：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，15min；