

海藻糖酶活性检测试剂盒说明书

Trehalase Assay Kit

分光光度法

货号: AK104

规格: 50T/24S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
提取液 ES15	50ml×1 瓶	4℃保存
AK104-A	30ml×1 瓶	4℃保存
AK104-B	粉剂×1 瓶	4℃保存; 用时加入 2mL AK105-A 液, 充分溶解待用, 4℃可保存一周
AK104-C	30ml×1 瓶	4℃保存
AK104-D	30ml×1 瓶	常温保存
AK104-标准品	粉剂×1 支	4℃保存; 临用前加入 1mL 蒸馏水溶解, 配制成 10mg/mL 标准液待用, 4℃可保存 2 周

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介:

意义: 海藻糖酶 (Trehalase, 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。

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。

自备用品:

可见分光光度计、水浴锅、可调式移液器、低温离心机、1ml 玻璃比色皿、研钵、冰和蒸馏水。

海藻糖提取:

1. 细菌或细胞处理: 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 ES15 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 ES15), 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 ES15 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 ES15), 冰浴匀浆; 8000g, 4℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

3. 血清 (浆) 的处理: 吸取约 0.1mL 血清 (浆), 加入 0.9mL 提取液 ES15, 冰浴匀浆; 8000g, 4℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

检测步骤:

- 分光光度计预热 30min, 调节波长到 550 nm, 蒸馏水调零。
- 将 10mg/mL 标准液用蒸馏水稀释至 2、1.5、1、0.5、0.25mg/mL, 现用现配。
- 加样表 (在 EP 管中依次加入下列试剂):

试剂名称	对照管 (ul)	测定管 (ul)	标准管 (ul)	空白管 (ul)
样本	180	180		
标准液			180	
蒸馏水				180

AK104-A	300	220	300	300
AK104-B		80		
37°C (哺乳动物) 或 25°C (其它物种) 水浴, 准确反应 10min				
AK104-C	400	400	400	400
AK104-D	400	400	400	400
混匀, 沸水浴 5min (盖紧, 以防止水分散失), 冷却后测定 550nm 处吸光值, 分别记为 A 对照、A 测定、A 标准、A 空白。计算 ΔA 测定=A 测定管-A 对照管, ΔA 标准=A 标准-A 空白。				

注：每个测定管均需设立一个对照管，标准曲线和空白管只需测 1-2 次。

计算公式：

1. 标准曲线的建立：

根据标准管的浓度 (x, mg/mL) 和吸光度 ΔA 标准 (y, ΔA 标准), 建立标准曲线, 再根据标准曲线, 将 ΔA (y, ΔA 测定) 带入公式计算样本浓度 (x, mg/mL)。

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 1 μ g 葡萄糖定义为一个酶活力单位。

$$\text{THL 活力(U/mg prot)} = 1000x \div \text{Cpr} \div T = 100x \div \text{Cpr}$$

3. 按样本鲜重计算：

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

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

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 1 μ g 葡萄糖定义为一个酶活力单位。

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

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 1 μ g 葡萄糖定义为一个酶活力单位。

$$\text{THL 活力 (U/mL)} = 1000x \div (V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 1000x$$

注：1000: 1mg/mL=1000 μ g/mL; T: 反应时间, 10min; V 样: 加入血清 (浆体积), 0.1mL;

V 样总: 样本总体积, 1 mL; 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。