

海藻糖酶（THL）活性检测试剂盒说明书

可见分光光度法

注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。

货号：BC2510

规格：50T/24S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 50mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 30mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	粉剂×2 支	2-8℃保存
试剂三	液体 30mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂四	液体 30mL×1 瓶	常温保存
标准品	粉剂×1 支	2-8℃保存

溶液的配制：

1. 试剂二：临用前取 1 支加入 1.2mL 试剂一，充分溶解待用，用不完的试剂 2-8℃保存 1 周；
2. 标准品：含 10mg 无水葡萄糖（干燥失重<0.2%），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，或者用饱和苯甲酸溶液溶解，2-8℃保存 4 周；

产品说明：

THL（EC3.2.1.28）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。

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。



注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计、水浴锅/恒温培养箱、可调式移液器、1mL玻璃比色皿、研钵/匀浆器、超声破碎仪、低温离心机、冰和蒸馏水。

操作步骤：

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

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；按照每 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液，超声波破碎，（冰浴，功率 200W，超声开 3 秒，关 10 秒，重复 30 次）；8000g，4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

2、组织的处理：称取约 0.1g 组织加入 1mL 提取液，冰浴中匀浆。8000g，4℃下离心 10min，取上清，置冰上待测。





3、血清（浆）的处理：吸取0.1mL血清（浆），加入0.9mL提取液，冰浴中匀浆。8000g，4℃下离心10min，取上清，置冰上待测。

二、测定步骤

1、分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 540nm，蒸馏水调零。

2、将 10mg/mL 标准液用蒸馏水稀释至 1、0.8、0.6、0.4、0.2mg/mL，现用现配，标准液稀释可参考下表。

序号	稀释前浓度 (mg/mL)	标准液体积 (μL)	蒸馏水体积 (μL)	稀释后浓度 (mg/mL)
1	10	100	900	1
2	1	160	40	0.8
3	1	120	80	0.6
4	1	80	120	0.4
5	1	40	160	0.2

备注：下述实验中每个标准管需 180μL 标准溶液（注意不要在此步骤直接检测标准溶液吸光度）。

3、样本测定（在 1.5mLEP 管中依次加入下列试剂）：

试剂名称 (μL)	对照管	测定管	标准管	空白管
样本	180	180	-	-
标准液	-	-	180	-
蒸馏水	-	-	-	180
试剂一	300	220	300	300
试剂二	-	80	-	-
置于37℃（哺乳动物）水浴锅/恒温水浴锅或25℃（其它物种）水浴锅中，准确反应时间10min				
试剂三	400	400	400	400
试剂四	400	400	400	400
涡旋混匀，100℃煮沸5min（缠封口膜，防止爆盖），冷却至室温后，测定540nm处吸光值，分别记为A对照、A测定、A标准、A空白。计算 $\Delta A_{测定} = A_{测定} - A_{对照}$ ， $\Delta A_{标准} = A_{标准} - A_{空白}$ 。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。				

三、THL活力计算

1、标准曲线的建立

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

2、按照蛋白浓度计算

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

$$THL \text{ 活力 (U/mgprot)} = 1000 \times y \div C_{pr} \div T = 100 \times y \div C_{pr}$$

3、按样本质量计算

单位的定义：每 g 组织在反应体系中每分钟催化产生 1μg 葡萄糖定义为一个酶活力单位。

$$THL \text{ 活力 (U/g 质量)} = 1000 \times y \div (W \div V_{样总}) \div T = 100 \times y \div W$$

4、按细菌或细胞数量计算

单位的定义：每 1 万个细菌或细胞在反应体系中每分钟催化产生 1μg 葡萄糖定义为一个酶活力单位。

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

4、按血清（浆）体积计算



单位的定义：每 mL 血清（浆）在反应体系中每分钟催化产生 1 μ g 葡萄糖定义为一个酶活力单位。

THL 活力 (U/mL) = $1000 \times y \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1000 \times y$

1000：单位换算系数，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，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。

相关发表文献：

- [1] Wang Q, Fang K, Qi L, Wang X, Pan Y, Li Y, Xi J, Zhang J. Purification and Functional Characterization of a Soluble Trehalase in *Lissorhoptrus oryzophilus* (Coleoptera: Curculionidae). *Insects*. 2022 Sep 24;13(10):867. doi: 10.3390/insects13100867. PMID: 36292815; PMCID: PMC9604388.
- [2] Liu J, Liu Z, Ma H, Yu Y, Zhang C, Zhong W, Man Y, Zhu H, Zhou Y, Chen X, Zhou X, Zeng A. C/EBP α Regulates PxTreh1 and PxTreh2 Trehalase-Related Bt Resistance in *Plutella xylostella* (L.). *Insects*. 2022 Mar 30;13(4):340. doi: 10.3390/insects13040340. PMID: 35447782; PMCID: PMC9024946.
- [3] Wu N, Xing M, Chen Y, Zhang C, Li Y, Song P, Xu Q, Liu H, Huang H. Improving the productivity of malic acid by alleviating oxidative stress during *Aspergillus niger* fermentation. *Biotechnol Biofuels Bioprod*. 2022 Dec 29;15(1):151. doi: 10.1186/s13068-022-02250-7. PMID: 36581946; PMCID: PMC9801644.
- [4] Li C, Lu X, Liu Y, Xu J, Yu W. Trehalose alleviates the inhibition of adventitious root formation caused by drought stress in cucumber through regulating ROS metabolism and activating trehalose and plant hormone biosynthesis. *Plant Physiol Biochem*. 2023 Dec;205:108159. doi: 10.1016/j.plaphy.2023.108159. Epub 2023 Nov 3. PMID: 37944244.
- [5] Bian C, Duan Y, Xiu Q, Wang J, Tao X, Zhou M. Mechanism of validamycin A inhibiting DON biosynthesis and synergizing with DMI fungicides against *Fusarium graminearum*. *Mol Plant Pathol*. 2021 Jul;22(7):769-785. doi: 10.1111/mpp.13060. Epub 2021 May 2. PMID: 33934484; PMCID: PMC8232029.

参考文献：

- [1] Goddijn OJ, Verwoerd TC, Voogd E, Krutwagen RW, de Graaf PT, van Dun K, Poels J, Ponstein AS, Damm B, Pen J. Inhibition of trehalase activity enhances trehalose accumulation in transgenic plants. *Plant Physiol*. 1997 Jan;113(1):181-90. doi: 10.1104/pp.113.1.181. PMID: 9008394; PMCID: PMC158129.
- [2] Küenzi MT, Fiechter A. Changes in carbohydrate composition and trehalase-activity during the budding cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Mikrobiol*. 1969;64(4):396-407. doi: 10.1007/BF00417021. PMID: 4916776.

相关系列产品：

BC0340/BC0345 糖原含量检测试剂盒
BC2540/BC2545 纤维素酶 (CL) 活性检测试剂盒
BC0330/BC0335 海藻糖含量检测试剂盒
BC2490/BC2495 血糖含量检测试剂盒
BC2530/BC2535 山梨醇脱氢酶活性检测试剂盒

