CheKine™ 海藻糖酶（THL）检测试剂盒（微量法）

Cat #: KTB1336 Size: 48 T/24 S 96 T/48 S

	海藻糖酶（THL）检测试剂盒（微量法）		
REF	**货号：**KTB1336	LOT	**批号：**见产品标签
	适用样本：动植物组织、细胞或真菌、血清（浆）或其他液体		
	保质期：-20℃，避光保存 6 个月		

原理

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。CheKine™ 海藻糖含量检测试剂盒（微量法）可检测动植物组织，细胞或真菌、血清（浆）或其他液体等生物样本。在该试剂盒中，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。

包装清单

试剂盒组分	规格		储存条件
	48 T	96 T	
Extraction Buffer	60 mL	60×2 mL	4℃
Reagent Ⅰ	Powder×1 vial	Powder×1 vial	4℃，避光保存
Reagent Ⅱ	8 mL	16 mL	4℃
Reagent Ⅲ	Powder×1 vial	Powder×1 vial	-20℃，避光保存
Reagent Ⅳ	8 mL	16 mL	4℃，避光保存
Standard	Powder×1 vial	Powder×1 vial	4℃，避光保存

注意：正式检测前，建议选择 2-3 个预期差异较大的样本进行预实验。

自备耗材

- 酶标仪或可见光分光光度计（能测 505 nm 处的吸光度）
- 96 孔板或微量玻璃比色皿、可调节式移液枪及枪头、1.5 mL 离心管
- 恒温箱、制冰机、低温离心机
- 去离子水
- 匀浆器或研钵（如果是组织样本）

Abbkine, Inc • • www.abbkine.com
Not for further distribution without written consent.Copyright © Abbkine, Inc.

试剂准备

Extraction Buffer：即用型；使用前，平衡到室温。4℃保存。

Working Reagent I：临用前配制；48 T 加入 4.2 mL 去离子水，96 T 加入 8.4 mL 去离子水，充分溶解待用。4℃避光保存可稳定 2 周。

Reagent II：即用型；使用前，平衡到室温。4℃保存。

Working Reagent III：临用前配制；48 T 加入 7.5 mL Reagent Ⅱ，96 T 加入 15 mL Reagent Ⅱ，充分溶解待用。用不完的试剂-20℃避光分装保存 1 个月，避免反复冻融。

Reagent Ⅳ：即用型；使用前，平衡到室温。4℃避光保存。

注意：Reagent Ⅲ 有毒，Reagent Ⅳ 有刺激性气味，建议在通风橱进行实验。

Working Reagent：每孔准备 180 μL 工作液，现配现用。将 Working Reagent Ⅲ 和 Reagent Ⅳ 按照 1：1 等体积混匀待用。

Standard：临用前配制；加入 1 mL 去离子水充分溶解，配制成 10 mg/mL 葡萄糖标准品；4℃避光保存可稳定 2 周。使用 10 mg/mL 葡萄糖标准品，按照下表所示，进一步稀释成标准品：

序号	Standard 体积（μL）	去离子水体积（μL）	浓度（mg/mL）
Std.1	100 μL of 10 mg/mL Standard	900	1
Std.2	160 μL of Std.1 (1 mg/mL)	40	0.8
Std.3	120 μL of Std.1 (1 mg/mL)	80	0.6
Std.4	80 μL of Std.1 (1 mg/mL)	120	0.4
Std.5	40 μL of Std.1 (1 mg/mL)	160	0.2
Blank	0	200	0

注意：每次实验，请使用新配制的标准品；配制好的标准品需要在 4 h 之内使用。

样本制备

注意：建议使用新鲜样本。如果不立即使用，可将样品在-80℃下保存一个月。测定时，应控制解冻的温度和时间。室温环境下解冻时，需在 4 h 内完成样品解冻。

1. 组织：称取约 0.1 g 样本，加入 1 mL Extraction Buffer，用匀浆器或研钵冰浴匀浆，8,000 g，4℃离心 10 min，取上清液待测。
2. 细胞或真菌：收集 500 万细胞或真菌到离心管内，用冷 PBS 清洗细胞或真菌，离心后弃上清，加入 1 mL Extraction Buffer，冰浴超声波破碎细胞或真菌 5 min（功率 20%或 200 W，超声 3 s，间隔 7 s，重复 30 次），8,000 g，4℃离心 10 min，取上清液待测。
3. 血清（浆）等液体样本：量取约 0.1 mL 样本，加入 1 mL Extraction Buffer，用匀浆器或研钵冰浴匀浆，8,000 g，4℃离心 10 min，取上清液待测。

注意：如需测定蛋白浓度，推荐使用 Abbkine 货号：KTD3001 的蛋白质定量试剂盒（BCA 法）进行样本蛋白质浓度测定。

实验步骤

1. 酶标仪或可见光分光光度计预热 30 min 以上，调节波长到 505 nm，可见光分光光度计用去离子水调零。
2. Working Reagent 置于 25℃（一般物种）或者 37℃（哺乳动物）孵育 10 min。
3. 操作表（下述操作在 1.5 mL EP 管中操作）：

试剂	空白孔（μL）	标准孔（μL）	测定孔（μL）	对照孔（μL）
样本	0	0	30	30
Standard	0	30	0	0

Not for further distribution without written consent.Copyright © Abbkine, Inc.

去离子水	30	0	0	50
Working Reagent Ⅰ	50	50	50	0
45℃水浴准确反应 15 min 后，95℃水浴 5 min 终止反应，10,000 g，4℃离心 10 min 后取上清。下述操作在 96 孔板或微量玻璃比色皿中操作:				
上清	20	20	20	20
Working Reagent	180	180	180	180

4. 充分混匀，混合液置于 25℃（一般物种）或者 37℃（哺乳动物）孵育 15 min，记录 505 nm 处吸光值，空白孔记为 $A_{空白}$，标准孔记为 $A_{标准}$，测定孔记为 $A_{测定}$，对照孔记为 $A_{对照}$。计算 $\Delta A_{测定}=A_{测定}-A_{对照}$，$\Delta A_{标准}=A_{标准}-A_{空白}$。

注意：空白管和标准管只需做 1-2 次。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 $\Delta A_{测定}$小于 0.05 可适当加大样本量。如果 $\Delta A_{测定}$大于 1.0，样本可用 Extraction Buffer 进一步稀释，计算结果乘以稀释倍数，或减少提取用样本量。

结果计算

注意：我们为您提供的计算公式，包括推导过程计算公式和简洁计算公式。两者完全相等。建议以加粗的简洁计算公式为最终计算公式。

1. 标准曲线的绘制

以标准溶液浓度为 x 轴，$\Delta A_{标准}$为 y 轴，绘制标准曲线，得到标准方程，将 $\Delta A_{测定}$带入方程得到 x (mg/mL)。

2. THL 活性的计算:

（1）按蛋白浓度计算

单位的定义：每 mg 组织蛋白每分钟催化产生 1 μg 葡萄糖定义为一个酶活力单位。

$THL\ (U/mg\ 蛋白)=(V_{反总}\times x)\div(V_{样}\times Cpr)\div T\times 1{,}000$**$=177.78x\div Cpr$**

（2）按样本鲜重计算:

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

$THL\ (U/g\ 鲜重)=(V_{反总}\times x)\div(V_{样}\times W\div V_{样总})\div T\times 1{,}000$**$=177.78x\div W$**

（3）按照真菌或细胞数量计算

单位的定义：每 10^4 真菌或细胞每分钟催化产生 1 μg 葡萄糖定义为一个酶活力单位。

$THL\ (U/10^4)=(V_{反总}\times x)\div(V_{样}\times n\div V_{样总})\div T\times 1{,}000$**$=177.78x\div n$**

（4）按样本体积计算:

单位的定义：每 mL 液体每分钟催化产生 1 μg 葡萄糖定义为一个酶活力单位。

$THL\ (U/mL)=(V_{反总}\times x)\div(V_{样}\times V_{液}\div V_{样总})\div T\times 1{,}000$**$=1{,}777.78x$**

$V_{反总}$：反应体系总体积，80 μL=0.08 mL；$V_{样}$：加入反应体系中样本体积，30 μL=0.03 mL；$V_{样总}$：加入 Extraction Buffer 体积，1 mL；$V_{液}$：加入血清（浆）等液体样本体积，0.1 mL；T：反应时间，15 min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；1,000：1 mg/mL=1,000 μg/mL；n：真菌或细胞总数，以万计。

结果展示

以下数据仅供参考，实验者需根据自己的实验对样品进行检测。

Not for further distribution without written consent.Copyright © Abbkine, Inc.

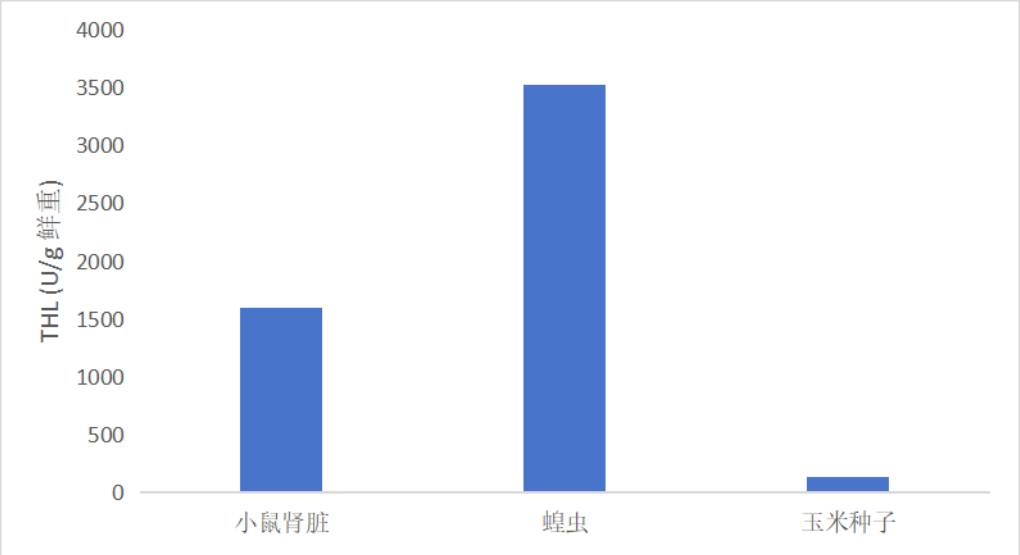


Figure 1. 本试剂盒测定小鼠肾脏、蝗虫和玉米种子中 THL 的含量

相关产品

Catalog No.	Product Name
KTB1410	CheKine™ 谷丙转氨酶（ALT/GPT）活性检测试剂盒（微量法）
KTB1420	CheKine™ 谷草转氨酶（AST/GOT）活性检测试剂盒（微量法）
KTB1430	CheKine™ 脯氨酸（PRO）含量检测试剂盒（微量法）

免责声明

本产品仅供科学研究使用，不适用于临床诊断。为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

Not for further distribution without written consent.Copyright © Abbkine, Inc.