



海藻糖合成酶活性检测试剂盒

TS Assay Kit

微量法

产品编号: AK403M

产品规格: 100T/48S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
ES403	60mL×1 瓶	4℃保存;
AK403-A	12mL×1 瓶	4℃保存;
AK403-B	12mL×1 瓶	4℃保存, 充分混匀, 如有沉淀, 静置后取上清液使用;
AK403-C	10mL×1 瓶	4℃避光保存;
AK403-D	10mL×1 瓶	4℃避光保存;
AK403-标准品	粉剂×1 支	临用前加入 1 mL 蒸馏水配制成 30 mmol/mL 的标准溶液, 用不完的试剂 4℃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: 海藻糖是功能性低聚糖, 具有非还原性、保湿性、热酸稳定性、抗冻结性等特性, 是细胞在不良环境条件下产生的一种重要的抗逆应激物之一, 它对生物大分子和生物体组织有着非特异性的保护作用。海藻糖合成酶 (Trehalose Synthase, TS) 催化麦芽糖合成海藻糖, 是海藻糖生物合成的关键途径之一。

原理: TS 催化麦芽糖产生海藻糖, 使用糖化酶分解剩余麦芽糖为葡萄糖, 通过葡萄糖氧化酶法测定葡萄糖含量, 按照麦芽糖减少的量表示海藻糖合酶活性。

自备用品:

酶标仪、水浴锅、可调式移液器、96 孔板、研钵、冰和蒸馏水。

样品处理:

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): ES403 体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 500 万细菌或细胞加入 1mL ES403), 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): ES403 体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL ES403), 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. 工作液配制: 临用前将 AK403-C 和 AK403-D 按照 1:1 的比例混合, 用多少配多少。
3. 将 30 mmol/mL 的标准液用蒸馏水倍比稀释为 6、5、4、3、2、1、0.5 mmol/mL 的标准溶液备用。
4. 加样表 (在 EP 管中依次加入下列试剂):

试剂名称	对照管 (μL)	测定管 (μL)	标准管 (μL)	空白管 (μL)
样本	50	50		
标准溶液			50	
AK403-A		50		
蒸馏水			50	100

充分混匀，35℃水浴反应 2 h，沸水浴 5 min 终止反应，冷却至室温。				
AK403-A	50			
AK403-B	100	100	100	100
混匀，40℃过夜反应（12 h 以上），沸水浴 5 min 终止反应，冷却至室温。10000 g，25℃离心 10 min，取上清待测。				
上清	20	20	20	20
工作液	180	180	180	180
充分混匀，37℃反应 30 min，于微量玻璃比色皿或 96 孔板中测定 505 nm 处的吸光值，分别记为 A 对照、A 测定、A 标准与 A 空白， ΔA 测定=A 对照-A 测定、 ΔA 标准=A 标准-A 空白。				

TS 酶活性计算公式：

1. 标准曲线的绘制：

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

2. 酶活性计算：

（1）按照蛋白浓度计算

单位的定义：每 mg 组织蛋白每分钟催化 1nmol 麦芽糖产生 1nmol 海藻糖定义为一个酶活力单位。

$$\text{TS 活力 (U/mg prot)} = x \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T \times 1000 \div 2$$

$$= 12.5x \div \text{Cpr}$$

（2）按样本鲜重计算

单位的定义：每 g 组织每分钟催化 1nmol 麦芽糖产生 1nmol 海藻糖定义为一个酶活力单位。

$$\text{TS 活力 (U/g 鲜重)} = x \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \times 1000 \div 2$$

$$= 12.5x \div W$$

（3）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 1nmol 麦芽糖产生 1nmol 海藻糖定义为一个酶活力单位。

$$\text{TS 活力 (U/10}^4 \text{ cell)} = x \times V_{\text{反总}} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \times 1000 \div 2$$

$$= 0.025x \div W$$

注：V 样：加入样本体积：0.1mL；V 样总：加入 ES403 体积，1 mL；V 反总：反应体系总体积，0.3mL；

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，120min；

1000， μmol 到 nmol 转换系数；2，1 分子麦芽糖转化为 2 分子葡萄糖。