



海藻糖-6-磷酸合成酶活性检测试剂盒

TPS Assay Kit

微量法

产品编号: AK404M

产品规格: 100T/96S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
ES404	100mL×1 瓶	4℃保存;
AK404-A	粉剂×1 瓶	-20℃保存; 临用前加入 12mL AK404-E 溶解, 剩余试剂分装后-20℃保存, 禁止反复冻融;
AK404-B	粉剂×2 瓶	-20℃保存; 临用前每瓶加入 10mL AK404-E 溶解; 现配现用;
AK404-C	粉剂×1 瓶	-20℃避光保存; 临用前加入 0.1mL AK404-E 溶解, 剩余试剂分装后-20℃保存, 禁止反复冻融;
AK404-D	100 μL×1 瓶	4℃避光保存; 临用前低速离心, 以防止试剂沾在管壁;
AK404-E	50mL×1 瓶	4℃保存;
工作液配制: 临用前, 先配置好 AK404-B 和 AK404-C, 然后在 AK404-B 瓶中加入 10 μL AK404-C 和 10 μL AK404-D, 充分混匀, 现配现用。		

※ 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: 海藻糖是由两个葡萄糖分子以 α, α -1-1 糖苷键连接而成的一种非还原双糖, 广泛存在于细菌、酵母菌、霉菌、食用菌、低等植物、昆虫、无脊椎动物和高等植物等多种有机体中。海藻糖的非还原性决定了它对酸、碱、高温等的稳定性。另外, 它本身具有很强的吸水性, 使它在生物体内具有抗脱水作用, 在逆境条件下可通过识别外界刺激、产生和传递信号、基因表达和代谢调节来保护植物免受不良环境的伤害。植物体内主要以葡萄糖为底物合成海藻糖, 该反应首先在海藻糖-6-磷酸合成酶 (trehalose-6-phosphate synthase, TPS) 的作用下, 催化尿苷二磷酸葡萄糖 (UDPG) 和 6-磷酸葡萄糖反应生成中间产物 6-磷酸海藻糖, 再在海藻糖-6-磷酸磷酸酶 (trehalose 6-phosphate phosphatase, TPP) 的作用下去磷酸化, 生成海藻糖。因此, 测定 TPS 活性对于研究植物逆境具有重要意义。

原理: 海藻糖-6-磷酸合成酶 (trehalose-6-phosphate synthase, TPS) 催化 UDPG 与 G6P 生成海藻糖-6-磷酸, 同时产生 UDP; UDP 在丙酮酸激酶与乳酸脱氢酶作用下, 氧化 NADH 为 NAD⁺, NADH 的下降速率与 UDP 含量成正比, 通过 340nm 吸光度下降速率反映 TPS 活性。

自备用品:

酶标仪/紫外分光光度计、水浴锅、可调式移液器、96 孔板(UV 板)/微量石英比色皿、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): ES404 体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 500 万细菌或细胞加入 1mL ES404), 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): ES404 体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL ES404), 冰浴中匀浆。8000g, 4℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

测定步骤:

1. 紫外分光光度计/酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 340nm, 蒸馏水调零。
2. 工作液配制: 详见试剂的组成和工作液的配制。
3. 在 EP 管中依次加入下列试剂:

试剂名称	测定管 (μL)
样本	100
AK404-A	100
混匀, 30°C 反应 20min, 95°C 水浴 2min 灭活, 冷却至室温。10000g 4°C 离心 5min, 取上层反应液待测。	
在微量比色皿或 96 孔板中加入如下试剂反应液	
反应液	20
工作液	180
混匀, 测定 340nm 下 5min 后吸光值 A1 与 10min 后吸光值 A2, $\Delta A = A1 - A2$ 。	

TPS 酶活性计算公式:

a. 使用微量比色皿测定的计算公式

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 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{TPS 活力 (U/mg prot)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T \times 3 = 643 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

2. 按样本鲜重计算

单位的定义: 每 g 组织每分钟催化 1nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{TPS 活力 (U/g 鲜重)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \times 3 = 643 \times \Delta A \div W$$

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 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{TPS 活力 (U/10}^4 \text{ cell)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \div (V_{\text{样}} \times \text{细胞数量}) \div T \times 3 = 1.28 \times \Delta A$$

注: $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, 0.2mL; ϵ : NADH 摩尔消光系数, $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$; d : 96 孔板光径, 1cm;

$V_{\text{样}}$: 加入样本体积, 0.1 mL; $V_{\text{样总}}$: 加入 ES404 体积, 1 mL; T : 反应时间, 5 min; 10, 稀释倍数; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W : 样本质量; 细胞数量, 500 万。

b. 使用 96 孔板测定的计算公式

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 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{TPS 活力 (U/mg prot)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T \times 10 = 1286 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

2. 按样本鲜重计算

单位的定义: 每 g 组织每分钟催化 1nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{TPS 活力 (U/g 鲜重)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \times 10 = 1286 \times \Delta A \div W$$

3. 按细菌或细胞密度计算

每 1 万个细菌或细胞每分钟催化 1nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{TPS 活力 (U/10}^4 \text{ cell)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \div (V_{\text{样}} \times \text{细胞数量}) \div T \times 10 = 2.57 \times \Delta A$$

注: $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, 0.2mL; ϵ : NADH 摩尔消光系数, $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$; d : 96 孔板光径, 0.5cm;

$V_{\text{样}}$: 加入样本体积, 0.1 mL; $V_{\text{样总}}$: 加入 ES404 体积, 1 mL; T : 反应时间, 5 min; 10, 稀释倍数; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W : 样本质量; 细胞数量, 500 万。

※ 蛋白定量检测建议使用本公司: BCA Protein Assay Kit ([C05-02001](#))