



海藻糖合成酶活性检测试剂盒

TS Assay Kit

可见分光光度法

产品编号：AK403V

产品规格：50T/24S

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 | 13mL×1 瓶 | 4℃保存； |
| AK403-B | 30mL×1 瓶 | 4℃保存，充分混匀，如有沉淀，静置后取上清液使用； |
| AK403-C | 25ml×1 瓶 | 4℃避光保存； |
| AK403-D | 25ml×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：

分光光度计、水浴锅、可调式移液器、1mL 玻璃比色皿、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)：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 | 250 | 250 | | |
| 标准溶液 | | | 250 | |
| AK403-A | | 250 | | |
| 蒸馏水 | | | 250 | 250 |
| 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 | 250 | | | |

| | | | | |
|---|-----|-----|-----|-----|
| AK403-B | 500 | 500 | 500 | 500 |
| 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 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 工作液 | 900 | 900 | 900 | 900 |
| 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, $\Delta A_{测定}=A_{对照}-A_{测定}$ 、 $\Delta A_{标准}=A_{标准}-A_{空白}$ 。 | | | | |

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 (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。

$$\begin{aligned} \text{TS 活力 (nmol/min/mg prot)} &= x \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T \times 1000 \div 2 \\ &= 33.3x \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

(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。

$$\begin{aligned} \text{TS 活力 (nmol/min/g 鲜重)} &= x \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \times 1000 \div 2 \\ &= 33.3x \div W \end{aligned}$$

(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。

$$\begin{aligned} \text{TS 活力 (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} &= x \times V_{\text{反总}} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \times 1000 \div 2 \\ &= 0.067x \div W \end{aligned}$$

注: V 样: 加入样本体积, 0.25mL; V 样总: 加入 ES403 体积, 1 mL; V 反总: 反应体系总体积, 2mL; 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。

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