



海藻糖-6-磷酸合成酶活性检测试剂盒

TPS Assay Kit

紫外分光光度法

产品编号：AK404U

产品规格：50T/48S

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 10mL 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 25mL 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	100mL×1 瓶	4℃保存；
工作液配制：临用前，先配置好 1 瓶 AK404-B 和 AK404-C，然后在 AK404-B 瓶中加入 25 μL AK404-C 和 25 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：

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) : 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. 分光光度计预热 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	150
AK404-A	150
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 1mL 玻璃比色皿中加入如下试剂反应液	
反应液	100
工作液	900
混匀, 测定 340nm 下 5min 后吸光值 A1 与 10min 后吸光值 A2, ΔA=A1-A2。	

TPS 酶活性计算公式:

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。

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

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。

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

3. 按细菌或细胞密度计算

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。

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

注: V 反应总: 反应体系总体积, 1mL; ε: NADH 摩尔消光系数, 6.22×10³ L / mol /cm; d: 比色皿光径, 1cm; V 样: 加入样本体积, 0.15 mL; V 样总: 加入 ES404 体积, 1 mL; T: 反应时间, 5 min; 3, 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](#))