

海藻糖-6-磷酸合成酶(TPS)检测试剂盒（微量法）

货号：PMK1880

保存：-20℃避光保存 6 个月

规格：48T/96T

适用样本：动植物组织、细胞、细菌、真菌

产品简介

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。本试剂盒提供了一种简单、方便、快速的 TPS 活性检测方法，其原理是：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 在 340nm 下有特征吸收峰，而 NAD 没有。NADH 的下降速率与 UDP 含量成正比，通过测定 340nm 吸光度下降速率反映 TPS 活性。

产品内容

试剂盒组分	规格		储存条件
	48T	96T	
提取液	50mL	100mL	4℃ 保存
试剂一	粉剂×1 瓶	粉剂×1 瓶	-20℃ 保存
试剂二	粉剂×1 瓶	粉剂×2 瓶	-20℃ 保存
试剂三	20 μ L	40 μ L	-20℃ 避光保存
试剂四	20 μ L	40 μ L	-20℃ 保存
试剂五	25mL	50mL	4℃ 保存

自备耗材

酶标仪或紫外分光光度计（能测 340nm 处的吸光度）
 96 孔 UV 微孔板或微量石英比色皿、可调节式移液枪及枪头
 水浴锅、制冰机，低温离心机
 去离子水
 匀浆器（如果是组织样本）

试剂准备

注意：各组分（小管试剂）开盖前，请先低速离心。

提取液：即用型；4℃ 保存。

试剂一：临用前 48T 加入 6mL 试剂五，96T 加入 12mL 试剂五溶解，用不完的试剂分装后 -20℃ 保存，避免反复冻融。

试剂二：临用前每瓶加入 10mL 试剂五溶解，现配现用。

试剂五：即用型；使用前，平衡到室温；4℃ 保存。

工作液的配制：临用前，取溶解后的试剂二一瓶，加入 10 μ L 试剂三和 10 μ L 试剂四，充分混匀，现配现用。

产品说明书

样本制备

组织：称取约 0.1g 样本，加入 1mL 提取液，冰浴匀浆，8,000g，4℃离心 10min，取上清液，置冰上待测。

细菌或细胞：收集 500 万细菌或细胞到离心管内，用冷 PBS 清洗细菌或细胞，离心后弃上清，加入 1mL 提取液，冰浴超声波破碎细胞 5min（功率 20%或 200W，超声 3s，间隔 7s，重复 30 次），然后 8,000g，4℃离心 10min，取上清液，置冰上待测。

注意：推荐使用新鲜样本，如果不立即进行实验，样本可在-80℃保存 1 个月。如需测定蛋白浓度，推荐使用 Bradford 蛋白质定量试剂盒进行样本蛋白质浓度测定。

实验步骤

1. 酶标仪或紫外分光光度计预热 30min 以上，调节波长到 340nm。紫外分光光度计去离子水调零。
2. 试剂一置于 30℃水浴 10min。
3. 样本测定：在 EP 依次加入下列试剂

	测定 (μL)
样本	100
试剂一	100

混匀，30℃反应 20min，95℃水浴 2min 灭活，冷却至室温。10,000g 4℃离心 5min，取上层反应液加入 96 孔板或微量玻璃比色皿中

反应液	20
工作液	180

混匀，室温放置，测定 340nm 下 1min 以后的吸光值 A_1 与 6min 后的吸光值 A_2 ，计算 $\Delta A = A_1 - A_2$ 。

注意：1. 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 ΔA 小于 0.001 可适当加大样本量，注意计算公式中调整样品质量；如果 ΔA 大于 0.5，可用提取液稀释样品，计算时结果乘以稀释倍数。

2. 测定反应的温度对测定结果有影响，请控制在对应温度。

3. 因通过反应速率计算酶活，使用 96 孔 UV 板时请根据操作速度控制一次测定的样本数（通常一次测定 4-8 个样本）。

结果计算

A. 使用 96 孔板测定的计算公式

1) 按样本鲜重计算：

单位的定义：每 g 组织产生的 UDP 在反应体系中每分钟消耗 1nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

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

2) 按细菌或细胞数量计算：

单位的定义：每 1 万个细菌或细胞产生的 UDP 在反应体系中每分钟消耗 1nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{TPS (U/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \times 10 = 2.57 \times \Delta A$$

3) 按样本蛋白浓度计算：

单位的定义：每 mg 组织蛋白产生的 UDP 在反应体系中每分钟消耗 1nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

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

$V_{\text{反应}}$ ：反应体系总体积， 2×10^{-4} L； ϵ ：NADH 摩尔消光系数， 6.22×10^3 L/mol/cm； d ：96 孔板光径，0.5cm； $V_{\text{样}}$ ：加入样本体积，0.1mL； $V_{\text{样总}}$ ：加入提取液体积，1mL； T ：反应时间，5min；10：反应时样本稀释倍数， $(100+100)/20=10$ ； 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。

B. 使用微量石英比色皿测定的计算公式

将上述计算公式中的光径 $d:0.5\text{cm}$ 调整为 $d:1\text{cm}$ 进行计算即可。

注意事项

1. 实验过程中请穿戴实验服、口罩和乳胶手套。请按照生物实验室的国家安全规定进行实验，尤其是在检测血样或其他体液时。
2. 本试剂盒仅用于实验室科学研究，如果本试剂盒用于临床诊断或任何其他用途，我们将不对任何后果负责。
3. 本试剂盒应在有效期内使用，并请严格按照说明书进行存储。
4. 不同批次号、不同厂家之间的组分不要混用；否则，可能导致结果异常。
5. 勤换吸头，避免各组分之间的交叉污染。

产品说明书

相关产品：

- PMK1177 海藻糖检测试剂盒（微量法）
- PMK1205 海藻糖合成酶(TS)检测试剂盒（微量法）
- PMK1178 海藻糖酶检测试剂盒（微量法）
- PMK1121 丙酮酸激酶（PK）检测试剂盒（微量法）
- PMK1001 乳酸脱氢酶（LDH）检测试剂盒（微量法）
- PMK1164 葡萄糖检测试剂盒（微量法）

更多产品详情了解，请关注公众号：

