

Trehalose 6-phosphate Synthase Activity Kit

海藻糖-6 磷酸合成酶 (TPS) 试剂盒说明书

货号: G0556W | 方法: 微板法 | 规格: 48 样

一、产品简介:

海藻糖-6磷酸合成酶 (TPS, EC 2.4.1.15) 是海藻糖合成的关键酶之一, 催化UDP-葡萄糖和葡萄糖-6磷酸生成海藻糖-6磷酸和UDP。UDP与磷酸烯醇式丙酮酸在丙酮酸激酶和乳酸脱氢酶的逐一作用下, 使NADH氧化为NAD⁺, 通过检测NADH在340nm处的下降量来计算TPS的酶活力大小。

二、试剂盒组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 60mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	粉剂 mg×1 支	4°C保存	用前甩几下或离心使粉剂落入底部, 再加 0.6mL 蒸馏水溶解备用。
试剂二	液体 19mL×1 瓶	4°C保存	
试剂三	粉剂 mg×1 支	4°C保存	用前甩几下或离心使粉剂落入底部, 再加 1.5mL 蒸馏水溶解备用。
试剂四	粉剂 mg×4 支	-20°C保存	用前甩几下或离心使粉剂落入底部, 分别加 0.3mL 蒸馏水溶解备用。用不完的试剂分装后-20°C保存, 禁止反复冻融, 三天内用完。
试剂五	粉剂 mg×2 支	-20°C保存	临用前甩几下使粉剂落入底部, 每支再加 0.6mL 蒸馏水充分溶解备用, 可分装冻存, 禁止反复冻融。
试剂六	粉剂 mg×2 支	-20°C保存	临用前甩几下使粉剂落入底部, 每支再加 0.6mL 蒸馏水充分溶解备用, 可分装冻存, 禁止反复冻融。

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、台式离心机、水浴锅/恒温培养箱/金属浴、可调式移液器、研钵、冰。

四、海藻糖-6磷酸合成酶 (TPS) 活性测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

1、样本制备:

① 组织样本:

称取约 0.1g 组织样本, 加入 1mL 提取液, 冰浴匀浆, 12000rpm, 4°C离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照组织质量 (g): 提取液体积(mL)为 1: 5~10 的比例进行提取。

② 细菌/真菌样本:

先收集细菌或真菌到离心管内, 离心后弃上清; 取 500 万细菌或真菌加入 1mL 提取液; 冰浴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), 8000rpm 室温 (25°C) 离心 10min, 取上清。

【注】: 若增加样本量, 可按照提取液体积(mL): 细菌或真菌数量(10⁴) 个 为 1:500~1000 的比例提取。

2、上机检测：

- ① 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 340nm。
- ② 所有试剂解冻至室温（25℃）。
- ③ 在 EP 管中依次加入：

试剂名称（ μL ）	测定管	对照管
样本	20	20
试剂一	10	
试剂二	70	80
混匀，35℃孵育 30min 后，立即于 95-100℃煮沸 5min，10000rpm，4℃离心 5min，上清液待测。		

- ④ 试剂二和三和四和五和六可按照 100:10:10:10:10 比例配成混合液（一枪加 140 μL ）（用多少配多少，现配现用），在 96 孔板中依次加入：

试剂二	100	100
试剂三	10	10
试剂四	10	10
试剂五	10	10
试剂六	10	10
③的上清液	60	60
混匀，35℃下立即于 340nm 处读取各管吸光值 A1，30min 后读取 A2。 $\Delta A=(A1-A2)_{\text{测定}}-(A1-A2)_{\text{对照}}$ 。		

注意：本操作流程适用于绝大多数常规样本检测，实验条件可根据实际样本状态适度微调；针对特殊类型样本，我司技术支持可提供专属优化建议。

五、结果计算：

1、按样本蛋白浓度计算：

单位定义：每毫克组织蛋白在每分钟内氧化 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{TPS 活力}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot})=[\Delta A \times V4 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \times (V2 \div V3) \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T = 178.6 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

2、按样本鲜重计算：

单位定义：每克组织在每分钟内氧化 1nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{TPS 活力}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重})=[\Delta A \times V4 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \times (V2 \div V3) \div (W \times V1 \div V) \div T = 178.6 \times \Delta A \div W$$

3、按细菌或真菌数量计算：

$$\text{TPS 活力}(\mu\text{g}/10^4\text{cell})=[\Delta A \times V4 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \times (V2 \div V3) \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.357 \times \Delta A$$

V---加入提取液体积，1 mL；

V1---加入样本体积，0.02mL；

V2---第③步的反应总体积，0.1mL；

V3---第④步中所取上清液体积，0.06mL；

V4---反应体系总体积， 2×10^{-4} L；

d---96 孔板光径，0.5cm；

ϵ ---NADH 摩尔消光系数， 6.22×10^3 L / mol / cm；

W---样本质量，g；

500---细菌或真菌总数，万；

T---反应时间，30min；

Cpr---蛋白浓度（mg/mL），建议使用本公司的 BCA 蛋白含量测定试剂盒。