

海藻糖合成酶 (Trehalose Synthase, TS) 试剂盒说明书

分光光度法 50 管/24 样

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义：

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) 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。

测定原理：

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。

需自备的仪器和用品：

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。

试剂的组成和配制：

提取液：液体 60mL×1 瓶，4℃保存；

试剂一：液体 6mL×1 瓶，4℃保存；

试剂二：液体 6ml×1 瓶，4℃保存，充分混匀，如有沉淀，静置后取上层清液使用；

试剂三：液体 25ml×1 瓶，4℃避光保存；

试剂三：液体 25ml×1 瓶，4℃避光保存；

样品测定的准备：

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)：提取液体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液)，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)：提取液体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液)，冰浴中匀浆。8000g，4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

测定步骤

1、在 EP 管中加入如下试剂

试剂名称 (μL)	对照管	测定管
样本		100
95℃水浴灭活样本	100	
试剂一	100	100

混匀，40℃水浴反应 2h，95℃水浴 10 分钟终止反应，冷却至室温。

试剂二	100	100
-----	-----	-----

混匀，60℃过夜反应，10000g 25℃离心 10min，取上清待测。

2、工作液配制：临用前将试剂三和试剂四按照 1:1 的比例混合，用多少配多少。

2、在 1mL 玻璃比色皿中加入如下试剂

上清	100	100
工作液	900	900

混匀，室温反应 30min，于 505nm 下测定吸光值 A 对照与 A 测定， $\Delta A = A_{\text{对照}} - A_{\text{测定}}$ 。

每个测定管设一个对照管。

TS 活力计算：

1、标准条件下测定回归方程为 $y = 0.747x - 0.0014$, $R^2 = 0.9999$; x 为标准品浓度 ($\mu\text{mol/mL}$), y 为吸光值。

2、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。

$$\begin{aligned}\text{TS 活力}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) &= (\Delta A + 0.0014) \div 0.747 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \times 1000 \div 2 \\ &= 16.7 \times (\Delta A + 0.0014) \div C_{\text{pr}}\end{aligned}$$

3、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。

$$\begin{aligned}\text{TS 活力}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= (\Delta A + 0.0014) \div 0.747 \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \times 1000 \div 2 \\ &= 16.7 \times (\Delta A + 0.0014) \div W\end{aligned}$$

4、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。

$$\begin{aligned}\text{TS 活力}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) &= (\Delta A + 0.0014) \div 0.747 \times V_{\text{反总}} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \times 1000 \div 2 \\ &= 0.033 \times (\Delta A + 0.0014)\end{aligned}$$

$V_{\text{样}}$ ：加入样本体积：0.1mL； $V_{\text{样总}}$ ：加入提取液体积，1 mL； $V_{\text{反总}}$ ：反应体系总体积，0.3mL； C_{pr} ：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。