海藻糖-6-磷酸合成酶（Trehalose-6-phosphate- Synthase，TPS）

试剂盒说明书

分光光度法 50 管/48 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。

测定原理：

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。

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 100mL×1 瓶，4℃保存；

试剂一：粉剂×1 瓶，-20℃保存；**临用前加入 10mL 试剂五溶解**，用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融；

试剂二：粉剂×2 瓶，-20℃保存；**临用前每瓶加入 25mL 试剂五溶解**；现配现用；

试剂三：粉剂×1 瓶，-20℃避光保存；**临用前加入 0.1mL 试剂五溶解**，用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融；

试剂四：100μL×1 瓶，4℃避光保存；临用前低速离心，以防止试剂沾在管壁；

试剂五：液体 100mL×1 瓶，4℃保存；

工作液的配制：临用前，先配置好试剂二和试剂三，然后取试剂二一瓶，加入 25μL 试剂三和 25μL 试剂四，充分混匀，现配现用。

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）	测定管
样本	150
试剂一	150

混匀，30℃反应 20min，95℃水浴 2min 灭活，冷却至室温。10000g 4℃离心 5min，取上层反应液待测。

2、工作液配制：详见试剂的组成和配制中工作液的配制。

3、在 1mL 玻璃比色皿中加入如下试剂

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 活力计算：

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 NADH 定义为一个酶活力单位。

TPS 活力(nmol/min/mg prot)=ΔA×V 反总÷（ε×d）×10^9÷（V 样×Cpr）÷T×3

=643×ΔA ÷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。

TPS 活力(nmol/min/g 鲜重)=ΔA×V 反总÷（ε×d）×10^9÷（W× V 样÷V 样总）÷T×3

=643×ΔA÷W

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 NADH 定义为一个酶活力单位。

TPS 活力(nmol/min/10^4 cell)=ΔA×V 反总÷（ε×d）×10^9÷（V 样×细胞数量）÷T×3

=1.28×ΔA

V 反总：反应体系总体积，1mL；ε：NADH 摩尔消光系数，6.22×10^3 L / mol /cm；d：比色皿光径，1cm；V 样：加入样本体积，0.15 mL；V 样总：加入提取液体积，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。