

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

分光光度法 50 管/48 样

注 意：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 石英比色皿、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;

试剂四：100 μ L×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 1 瓶试剂二和试剂三, 然后在试剂二瓶中加入 25 μ L 试剂三和 25 μ L 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 (10⁴ 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)	测定值
样本	150
试剂 1	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	900
工作液	100

混匀, 测定 340nm 下 5min 后吸光值 A1 与 10min 后吸光值 A2, $\Delta A=A1-A2$ 。

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)= $\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109 \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \times 3$
=643 × $\Delta A \div C_{\text{pr}}$

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)= $\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109 \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \times 3 = 643 \times \Delta A \div W$

3、按细菌或细胞密度计算

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/10⁴ cell)= $\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109 \div (V_{\text{样}} \times \text{细胞数量}) \div T \times 3$
=1.28 × ΔA

V 反总: 反应体系总体积, 1mL; ϵ : NADH 摩尔消光系数, 6.22 × 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。