

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

微量法 100 管/96 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：

酶标仪、水浴锅、可调式移液器、96 孔板、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 12mL 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 10mL 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 50mL×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 10 μ L 试剂三和 10 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)	测定管
样本	100
试剂一	100

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 96 孔板中加入如下试剂

反应液	20
工作液	180

混匀, 测定 340nm 下反应 5min 后的吸光值 A1 与 10min 后的吸光值 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)= $\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109 \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \times 10$
 $= 1286 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$

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)= $\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109 \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \times 10 = 1286 \times \Delta A \div W$

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)= $\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109 \div (V_{\text{样}} \times \text{细胞数量}) \div T \times 10$
 $= 2.57 \times \Delta A$

V 反总: 反应体系总体积, 0.2mL; ϵ : NADH 摩尔消光系数, $6.22 \times 10^3 \text{ L} / \text{mol} / \text{cm}$; d: 96

孔板光径, 0.5cm; V 样: 加入样本体积, 0.1 mL; V 样总: 加入提取液体积, 1 mL; T:

反应时间, 5 min; 10, 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。