

## 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  $\alpha, \alpha$ -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<sup>+</sup>，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  $\mu$ 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  $\mu$ L 试剂三和 10  $\mu$ 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 (10<sup>4</sup> 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； $\epsilon$ ：NADH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$ ；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。

