

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

微量法 100 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:

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 60mL×1 瓶, 4°C 保存;

试剂一: 液体 12mL×1 瓶, 4°C 保存;

试剂二: 液体 12ml×1 瓶, 4°C 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 10ml×1 瓶, 4°C 避光保存;

试剂四: 液体 10ml×1 瓶, 4°C 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°C 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°C 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°C 水浴灭活样本	100	
试剂一	100	100

混匀, 40°C 水浴反应 2h, 95°C 水浴 10 分钟终止反应, 冷却至室温。

试剂二	100	100
-----	-----	-----

混匀, 60°C 过夜反应, 10000g 25°C 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 96 孔板中加入如下试剂

上清	20	20
工作液	180	180

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  $y = 0.3735x - 0.0014$ ,  $R^2 = 0.9999$ ; 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。

$$\begin{aligned} \text{TS 活力}(\text{nmol/min/mg prot}) &= (\Delta A + 0.0014) \div 0.3735 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \times 1000 \div 2 \\ &= 33.5 \times (\Delta A + 0.0014) \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

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。

$$\begin{aligned} \text{TS 活力}(\text{nmol/min/g 鲜重}) &= (\Delta A + 0.0014) \div 0.3735 \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \times 1000 \div 2 \\ &= 33.5 \times (\Delta A + 0.0014) \div W \end{aligned}$$

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。

$$\begin{aligned} \text{TS 活力}(\text{nmol/min}/10^4 \text{ cell}) &= (\Delta A + 0.0014) \div 0.3735 \times V_{\text{反总}} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \times 1000 \div 2 \\ &= 0.067 \times (\Delta A + 0.0014) \end{aligned}$$

V 样：加入样本体积：0.1mL；V 样总：加入提取液体积，1 mL；V 反总：反应体系总体积，0.3mL；Cpr：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， $\mu\text{mol}$  到 nmol 转换系数；2，1 分子麦芽糖转化为 2 分子葡萄糖。