

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

试剂盒说明书

微量法 100 管/96 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:

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°C 保存;

试剂一: 粉剂×1 瓶, -20°C 保存; 临用前加入 12mL 试剂五溶解, 用不完的试剂分装后-20°C 保存, 禁止反复冻融;

试剂二: 粉剂×2 瓶, -20°C 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°C 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°C 保存, 禁止反复冻融;

试剂四: 100 μ L×1 瓶, 4°C 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°C 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 (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)	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。

$$\begin{aligned} \text{TPS 活力}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) &= \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \times 10 \\ &= 1286 \times \Delta A \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

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。

$$\begin{aligned} \text{TPS 活力}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \times 10 \\ &= 1286 \times \Delta A \div W \end{aligned}$$

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。

$$\begin{aligned} \text{TPS 活力}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) &= \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \div (V_{\text{样}} \times \text{细胞数量}) \div T \times 10 \\ &= 2.57 \times \Delta A \end{aligned}$$

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。