

海藻糖-6-磷酸酯酶 (Trehalose-6-phosphate phosphatase, TPP)

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:

海藻糖又称为漏芦糖、蕈糖,是由两个葡萄糖分子组成的一个非还原性双糖,能够在高温、高寒、高渗透压及干燥失水等恶劣环境条件下在细胞表面形成独特的保护膜,有效地保护生物分子结构不被破坏,从而维持生命体的生命过程和生物特征。

植物体内主要以葡萄糖为底物合成海藻糖,海藻糖-6-磷酸酯酶 (trehalose 6-phosphate phosphatase, TPP) 是该途径中海藻糖合成关键酶之一,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-磷酸葡萄糖生成中间产物6-磷酸海藻糖,再在TPP的作用下去磷酸化,生成海藻糖。

测定原理:

TPP 催化海藻糖-6-磷酸产生海藻糖,同时释放出磷酸根,使用钼锑抗比色法测定。

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: 液体 12mL×1 瓶, 4℃保存;

试剂二: 液体 6mL×1 支, 4℃保存。

试剂三: 粉剂×1 支, 4℃避光保存。临用前加 2mL 蒸馏水溶解。用不完的试剂 4℃保存。

试剂四: 粉剂×3 支, 4℃避光保存。临用前加 1mL 蒸馏水溶解。**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℃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)	对照管	测定管
样本		100
95℃水浴灭活样本	100	
试剂一	100	100

混匀, 37℃反应 30min, 95℃水浴 5min 终止反应, 冷却至室温。10000g 4℃离心 5min, 取反应液待测。

2、显色液的配制 (可测 50 管): 取 EP 管一支, 加入 660μL 试剂二, 再加入 100μL 试剂三, 充分混匀后, 再加入 240μL 试剂四, 充分混匀待用; 配好的显色液应为黄色, 若变蓝则为磷

污染：显色液必须现配现用；若一次性测不了 50 个样，可按比例缩小各试剂体积。

3、在 96 孔板中加入如下试剂

	对照管	测定管
测定反应液 (μL)		40
对照反应液 (μL)	40	
显色液 (μL)	20	20
蒸馏水 (μL)	140	140

测定 660nm 处吸光值 A，分别记为 A 对照和 A 测定， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ 。

TPP 活力计算：

标准条件下标准曲线为 $y = 1.9403x - 0.0036$ ， $R^2 = 0.9985$ ；其中 x 为标准品浓度，μmol/mL，y 为吸光值 ΔA 。

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产生 1nmol 无机磷定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{TPP 活力}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) &= (\Delta A + 0.0036) \div 1.9403 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \times 1000 \\ &= 34.35 \times (\Delta A + 0.0036) \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

2、按样本鲜重计算

单位的定义：每 g 组织每分钟催化产生 1nmol 无机磷定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{TPP 活力}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= (\Delta A + 0.0036) \div 1.9403 \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \times 1000 \\ &= 34.35 \times (\Delta A + 0.0036) \div W \end{aligned}$$

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产生 1nmol 无机磷定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{TPP 活力}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) &= (\Delta A + 0.0036) \div 1.9403 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{细胞数量}) \div T \times 1000 \\ &= 0.069 \times (\Delta A + 0.0036) \end{aligned}$$

V 反总：反应体系总体积，0.2mL；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，30 min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量；细胞数量，500 万；1000，μmol 到 nmol 的换算系数。