

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

## 分光光度法 50 管/24 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：**

分光光度计、水浴锅、可调式移液器、1mL 玻璃比色皿、研钵、冰和蒸馏水。

**试剂的组成和配制：**

提取液：液体 60mL×1 瓶，4℃保存；

试剂一：液体 6mL×1 瓶，4℃保存；

试剂二：液体 6ml×1 瓶，4℃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 25ml×1 瓶，4℃避光保存；

试剂四：液体 25ml×1 瓶，4℃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℃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，40℃水浴反应 2h，95℃水浴 10 分钟终止反应，冷却至室温。

|     |     |     |
|-----|-----|-----|
| 试剂二 | 100 | 100 |
|-----|-----|-----|

混匀，60℃过夜反应，10000g 25℃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。

3、在 1mL 玻璃比色皿中加入如下试剂

|     |     |     |
|-----|-----|-----|
| 上清  | 100 | 100 |
| 工作液 | 900 | 900 |

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  $y = 0.747x - 0.0014$ ,  $R^2 = 0.9999$ ;  $x$  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  $\text{mg}$  组织蛋白每分钟催化  $1\text{nmol}$  麦芽糖产生  $1\text{nmol}$  海藻糖定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned}\text{TS 活力}(\text{nmol/min/mg prot}) &= (\Delta A + 0.0014) \div 0.747 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \times 1000 \div 2 \\ &= 16.7 \times (\Delta A + 0.0014) \div C_{\text{pr}}\end{aligned}$$

3、按样本鲜重计算

单位的定义：每  $\text{g}$  组织每分钟催化  $1\text{nmol}$  麦芽糖产生  $1\text{nmol}$  海藻糖定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned}\text{TS 活力}(\text{nmol/min/g 鲜重}) &= (\Delta A + 0.0014) \div 0.747 \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \times 1000 \div 2 \\ &= 16.7 \times (\Delta A + 0.0014) \div W\end{aligned}$$

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  $1\text{nmol}$  麦芽糖产生  $1\text{nmol}$  海藻糖定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned}\text{TS 活力}(\text{nmol/min}/10^4 \text{ cell}) &= (\Delta A + 0.0014) \div 0.747 \times V_{\text{反总}} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \times 1000 \div 2 \\ &= 0.033 \times (\Delta A + 0.0014)\end{aligned}$$

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