

海藻糖合成酶（TS）检测试剂盒（微量法）

注意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

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。

试剂组成和配制：

提取液：液体 60mL×1 瓶，4℃保存；

试剂一：液体 12mL×1 瓶，4℃保存；

试剂二：液体 12ml×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 10ml×1 瓶，4℃避光保存；

试剂四：液体 10ml×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（ μ L）	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 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。

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

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， μmol 到 nmol 转换系数；

2，1 分子麦芽糖转化为 2 分子葡萄糖。