

海藻糖-6 磷酸合成酶 (TPS) 试剂盒说明书

(货号: ADS-W-HZT002-48 微板法 48 样 有效期: 3 个月)

一、指标介绍:

海藻糖-6磷酸合成酶 (TPS, EC 2.4.1.15) 是海藻糖合成的关键酶之一, 催化UDP-葡萄糖和葡萄糖-6磷酸生成海藻糖-6磷酸和UDP。UDP与磷酸烯醇式丙酮酸在丙酮酸激酶和乳酸脱氢酶的逐一作用下, 使NADH氧化为NAD⁺, 通过检测NADH在340nm处的下降量来计算TPS的酶活力大小。

二、试剂盒组成和配制:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 60mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	粉剂 1 支	4°C保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底 (可手动甩一甩); 2. 加入 0.6mL 蒸馏水溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂二	液体 19mL×1 瓶	4°C保存	
试剂三	粉剂 1 支	4°C保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底 (可手动甩一甩); 2. 再加 1.5mL 蒸馏水溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂四	粉剂 4 支	-20°C保存	每支: 1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底 (可手动甩一甩); 2. 分别加 0.3mL 蒸馏水溶解备用; 3. 用不完的试剂分装后-20°C保存, 禁止反复冻融, 三天内用完。
试剂五	粉剂 2 支	-20°C保存	每支: 1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底 (可手动甩一甩); 2. 每支再加 0.6mL 蒸馏水充分溶解备用, 可分装冻存, 禁止反复冻融。
试剂六	液体 2 支	-20°C保存	每支: 1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底 (可手动甩一甩); 2. 每支再加 0.6mL 蒸馏水充分溶解备用, 可分装冻存, 禁止反复冻融。

三、实验器材:

研钵 (匀浆机)、冰盒 (制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅 (烘箱、培养箱、金属浴)、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

四、海藻糖-6磷酸合成酶 (TPS) 活性测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本 (例如不同类型或分组) 进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

1、样本提取:

① 组织样本:

称取约 0.1g 组织样本, 加入 1mL 提取液, 冰浴匀浆, 12000rpm, 4°C离心 10min, 取上清, 置冰

上待测。

【注】：若增加样本量，可按照组织质量 (g) : 提取液体积(mL)为 1: 5~10 的比例进行提取。

② 细菌/真菌样本：

先收集细菌或真菌到离心管内，离心后弃上清；取 500 万细菌或真菌加入 1mL 提取液；冰浴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），8000rpm 室温 (25°C) 离心 10min，取上清。

【注】：若增加样本量，可按照提取液体积(mL)：细菌或真菌数量(10^4) 个为 1:500~1000 的比例提取。

2、检测步骤：

① 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 340nm。

② 所有试剂解冻至室温 (25°C) 。

③ 在 EP 管中依次加入：

试剂组分 (μL)	测定管	对照管
样本	20	20
试剂一	10	
试剂二	70	80
混匀，35°C 孵育 30min 后，立即于 95-100°C 煮沸 5min，10000rpm，4°C 离心 5min，上清液待测。		

④ 试剂二和三和四和五和六可按照 100:10:10:10:10 比例配成混合液（一枪加 140μL）（用多少配多少，现配现用），在 96 孔板中依次加入：

试剂二	100	100
试剂三	10	10
试剂四	10	10
试剂五	10	10
试剂六	10	10
③的上清液	60	60
混匀，35°C 下立即于 340nm 处读取各管吸光值 A1，30min 后读取 A2。 $\Delta A = (A1 - A2)_{测定} - (A1 - A2)_{对照}$ 。		

【注】 1.若 ΔA 小于 0.01，可以适当延长③步的反应时间 T 到 60min 或更长。或适当加大样本量 V1（如 50μL，则试剂二相应减少），则改变后的 T 和 V1 需代入公式重新计算。

2.若起始值 A1 太大如超过 2（如颜色较深的样本）或 ΔA 的值大于 0.4，可以适当减少③的上清液加样量 V3（如减少至 40μL，则试剂二相应增加），则改变后的加样体积 V3 需代入计算公式重新计算。

五、结果计算：

1、按样本蛋白浓度计算：

单位定义：每毫克组织蛋白在每分钟内氧化 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

TPS 活力(nmol/min/mg prot)=[$\Delta A \times V_4 \div (\epsilon \times d) \times 10^9$] $\times (V_2 \div V_3) \div (V_1 \times C_{pr}) \div T = 178.6 \times \Delta A \div C_{pr}$

2、按样本鲜重计算：

单位定义：每克组织在每分钟内氧化 1nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

TPS 活力(nmol/min/g 鲜重)=[$\Delta A \times V_4 \div (\epsilon \times d) \times 10^9$] $\times (V_2 \div V_3) \div (W \times V_1 \div V) \div T = 178.6 \times \Delta A \div W$

3、按细菌或真菌数量计算：

TPS 活力($\mu\text{g}/10^4\text{cell}$)=[$\Delta A \times V_4 \div (\epsilon \times d) \times 10^9$] $\times (V_2 \div V_3) \div (500 \times V_1 \div V) \div T = 0.357 \times \Delta A$

