海藻糖合成酶（Trehalose Synthase，TS）试剂盒

分光光度法 50 管/24 样

注　意：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；

试剂三：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（104 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。

混匀，60℃过夜反应，10000g 25℃离心 10min，取上清待测。

2、工作液配制：

3、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。

在 1mL 玻璃比色皿中加入如下试剂混匀，室温反应 30min，于 505nm 下测定吸光值 A 对照与 A 测定，ΔA=A 对照-A 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，R2 = 0.9999；x 为标准品浓度（μmol/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。

TS 活力(nmol/min/mg prot)=(ΔA+0.0014) ÷0.747×V 反总÷(V 样×Cpr)÷T×1000÷2

=16.7×(ΔA+0.0014) ÷Cpr

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。 TS 活力(nmol/min/g 鲜重)=(ΔA+0.0014) ÷0.747×V 反总÷(W ×V 样÷V 样总) ÷T×1000÷2

=16.7×(ΔA+0.0014)÷W

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。

TS 活力(nmol/min/104 cell)=(ΔA+0.0014) ÷0.747×V 反总÷(500 ×V 样÷V 样总) ÷T×1000÷2 =0.033×(ΔA+0.0014)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。