

海藻糖合成酶（TS）活性检测试剂盒说明书

微量法

注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。

货号：BC4955

规格：100T/48S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 60 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 7 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	粉剂×1 瓶	2-8℃保存
试剂三	液体 10 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂四	液体 10 mL×1 瓶	2-8℃保存

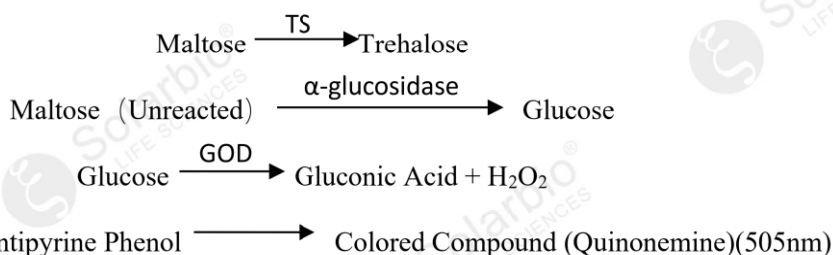
溶液的配制：

- 1、试剂一：也用作标准品使用，浓度为 6μmol/mL。
- 2、试剂二：临用前先加入 11 mL 蒸馏水，震荡使其充分溶解，用不完的试剂 2-8℃保存 4 周。
- 3、工作液的配制：临用前将试剂三和试剂四 1:1 等体积混合，根据样本实际所需用量现配现用。

产品说明：

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组织有着非特异性的保护作用。海藻糖合成酶（Trehalose Synthase, TS, EC 2.1.1.318）存在于非脊椎动物中，能催化麦芽糖生成海藻糖，是海藻糖生物合成的关键途径之一。

本试剂盒使用 α-葡萄糖苷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成酶的活性。



注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计/酶标仪、微量玻璃比色皿/96孔板、低温离心机、恒温水浴锅、可调式移液枪、研钵/匀浆器/细胞超声破碎仪、蒸馏水。

操作步骤：

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）





1. 组织：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），进行冰浴匀浆。8000 g，4℃，离心10 min，取上清，置冰上待测（若上清不够澄清，建议重复上述离心步骤，置于冰上待检）。
2. 细菌或细胞：收集细菌或细胞到离心管内，弃上清，按照每500万细菌或细胞加入1mL提取液，超声波破碎细菌或细胞（功率 200W，超声3s，间隔9s，重复30次），8000g，4℃离心10min，取上清（若上清不够澄清，建议重复上述离心步骤），置于冰上待检。

二、测定步骤

- 1、分光光度计/酶标仪预热30 min以上，调节波长至505 nm，分光光度计蒸馏水调零。

- 2、操作表：

- 3、（1）酶促反应（在EP管中进行以下操作）：

试剂名称（μL）	对照管	测定管	标准管	空白管
样本	50	50	-	-
试剂一	-	50	50	-
蒸馏水	-	-	50	100
充分混匀，37℃水浴反应1 h，沸水浴10 min终止反应（缠封口膜，防止爆盖），冷却至室温。				
试剂一	50	-	-	-
试剂二	100	100	100	100
混匀，37℃水浴反应30min，沸水浴10 min（缠封口膜，防止爆盖）终止反应，冷却至室温。 10000 g，25℃离心10 min，取上清待测。				

- 4、（2）显色反应（在 EP 管或 96 孔板中进行以下操作）

试剂名称（μL）	对照管	测定管	标准管	空白管
上清液	20	20	20	20
工作液	180	180	180	180
充分混匀，37℃反应30 min，于微量玻璃比色皿或96孔板中测定505 nm处的吸光值，分别记为A对照、A测定、A标准与A空白，计算ΔA测定=A对照-A测定、ΔA标准=A标准-A空白。空白管和标准管只需测1~2次。				

三、酶活性计算

- 1、按样本蛋白浓度计算：

单位的定义：每mg组织蛋白每分钟催化1 nmol 麦芽糖生成1 nmol 海藻糖定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{TS酶活 (U/mg prot)} &= \text{C标} \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \times F \times 1000 \div 2 \\ &= 50 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div C_{\text{pr}} \times F \end{aligned}$$

- 2、按样本质量计算：

单位的定义：每g组织每分钟催化1 nmol 麦芽糖生成1 nmol 海藻糖定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{TS酶活 (U/g 质量)} &= \text{C标} \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T \times F \times 1000 \div 2 \\ &= 50 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div W \times F \end{aligned}$$

- 3、按细菌或细胞数量计算：

单位的定义：每10⁴个细菌或细胞每分钟催化1 nmol 麦芽糖生成1 nmol 海藻糖定义为一个酶活力单位。



$$\text{TS酶活 (U/10}^4\text{ cell)} = \text{C标} \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times N1) \div T \times F \times 1000 \div 2 \\ = 50 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div N \times F$$

C标: 标准管浓度, 6 $\mu\text{mol/mL}$; V样总: 加入提取液体积, 1 mL; V样: 加入样本体积, 0.05 mL; T: 反应时间, 60 min; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量, g; N: 细胞或细菌总数, 以万计; F: 稀释倍数; 1000: 单位换算系数, 1 $\mu\text{mol}=1000\text{ nmol}$; 2: 1分子麦芽糖可转化为2分子葡萄糖。

注意事项:

1. 当 ΔA 测定 >1.5 时, 建议将样本匀浆液用蒸馏水稀释后再进行测定; ΔA 测定 <0.01 , 建议延长第一步 37°C 水浴反应或者加大样本质量进行实验。

实验实例:

1. 称取 0.1g 蜈蚣昆虫, 按前处理匀浆离心后按操作表检测, 使用 96 孔板测定并计算 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{对照}} - A_{\text{测定}} = 0.805 - 0.763 = 0.042$, $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}} = 0.841 - 0.051 = 0.79$, 按质量计算酶活:

$$\text{TS 酶活 (U/g 质量)} = 50 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div W \times F = 26.58 \text{ U/g 质量}$$

相关系列产品:

BC0330/BC0335 海藻糖含量检测试剂盒

BC2510/BC2515 海藻糖酶 (THL) 活性检测试剂盒

