

海藻糖合成酶（TS）活性检测试剂盒说明书

可见分光光度法

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：BC4950

规格：50T/24S

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 30 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 9 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	粉剂×1 瓶	2-8℃保存
试剂三	液体 30 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂四	液体 30 mL×1 瓶	2-8℃保存

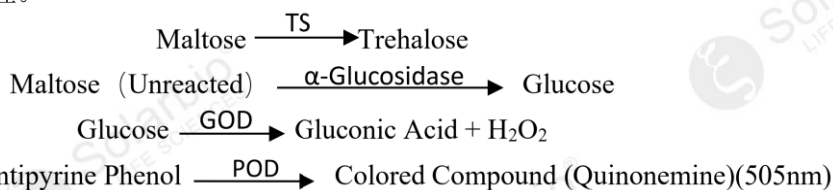
溶液的配制：

- 1、试剂一：也用作标准品使用，浓度为 $3\mu\text{mol/mL}$ 。
- 2、试剂二：临用前先加入 12 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、1 mL 玻璃比色皿、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/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、分光光度计预热30 min以上，调节波长至505 nm，蒸馏水调零。

2、操作表：

(1) 酶促反应（在EP管中进行如下操作）：

试剂名称（μL）	对照管	测定管	标准管	空白管
样本	100	100	-	-
试剂一	-	100	100	-
蒸馏水	-	-	100	200
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	100	-	-	-
试剂二	200	200	200	200
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。10000g，25℃离心10 min，取上清待测。				

(2) 显色反应（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
上清液	100	100	100	100
工作液	900	900	900	900
充分混匀，37℃反应30 min，于1 mL玻璃比色皿中测定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。

$$\begin{aligned} \text{TS酶活 (U/mg prot)} &= C_{\text{标}} \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \times F \div 2 \\ &= 25 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div C_{\text{pr}} \times F \end{aligned}$$

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。

$$\begin{aligned} \text{TS酶活 (U/g 质量)} &= C_{\text{标}} \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T \times F \div 2 \\ &= 25 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div W \times F \end{aligned}$$

3、按细菌或细胞数量计算：



单位的定义：每 10^4 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。

$$\text{TS酶活 (U/10}^4 \text{ cell)} = \text{C标} \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times N) \div T \times F \div 2 \\ = 25 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div N \times F$$

C标：标准管浓度， $3 \mu\text{mol/mL} = 3 \times 10^3 \text{ nmol/mL}$ ；V样总：加入提取液体积，1 mL；V样：加入样本体积，0.1 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；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1mL 玻璃比色皿测定并计算 ΔA 测定=A 对照-A 测定 $=1.009-0.939=0.07$ ， ΔA 标准=A 标准-A 空白 $=0.803-0.006=0.797$ ，按质量计算酶活：

$$\text{TS酶活 (U/g 质量)} = 25 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div W \times F = 21.95 \text{ U/g 质量}$$

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

