

海藻糖-6 磷酸合成酶 (TPS) 试剂盒说明书

(分光法 24 样)

一、产品简介:

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:

| 试剂名称 | 规格 | 保存要求 | 备注 |
|------|-------------|---------|--|
| 提取液 | 液体 30mL×1 瓶 | 4℃ 保存 | |
| 试剂一 | 粉剂 mg×1 支 | 4℃ 保存 | 用前甩几下或离心使粉剂落入底部, 再加 0.9mL 蒸馏水溶解备用。 |
| 试剂二 | 液体 32mL×1 瓶 | 4℃ 保存 | |
| 试剂三 | 粉剂 mg×1 支 | 4℃ 保存 | 用前甩几下或离心使粉剂落入底部, 再加 2.2mL 蒸馏水溶解备用。 |
| 试剂四 | 粉剂 mg×4 支 | -20℃ 保存 | 用前甩几下或离心使粉剂落入底部, 分别加 0.55mL 蒸馏水溶解备用。用不完的试剂分装后-20℃ 保存, 禁止反复冻融, 三天内用完。 |
| 试剂五 | 粉剂 mg×1 支 | -20℃ 保存 | 用前甩几下或离心使粉剂落入底部, 再加 1.1mL 蒸馏水溶解备用。 |

三、所需的仪器和用品:

紫外分光光度计、1mL 石英比色皿 (光径 1cm)、台式离心机、水浴锅/恒温培养箱/金属浴、可调式移液器、研钵、冰。

四、海藻糖-6磷酸合成酶 (TPS) 活性测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

1、样本制备:

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℃ 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), 室温晃动提取 30min, 8000rpm 室温 (25℃) 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 (10⁴ 个) 为 1: 500~1000 的比例提取

2、上机检测:

① 紫外分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 340nm, 蒸馏水调零。

② 所有试剂解冻至室温 (25℃)。

③ 在 EP 管中依次加入:

| 试剂名称 (μL) | 测定管 | 对照管 |
|-----------|-----|-----|
| 样本 | 60 | 60 |

| | | |
|---|-----|-----|
| 试剂一 | 30 | |
| 试剂二 | 210 | 240 |
| 混匀, 35℃孵育 30min 后, 立即于 95-100℃煮沸 5min, 10000rpm, 4℃离心 5min, 上清液待测。 | | |

④ 在 1mL 石英比色皿中依次加入:

| | | |
|--|-----|-----|
| 试剂二 | 400 | 400 |
| 试剂三 | 40 | 40 |
| 试剂四 | 40 | 40 |
| 试剂五 | 20 | 20 |
| ③的上清液 | 200 | 200 |
| 混匀, 35℃下立即于 340nm 处读取各管吸光值 A1, 30min 后读取 A2。△A=(A1-A2)测定-(A1-A2)对照。 | | |

- 【注】** 1. 若△A 的值在零附近, 可以适当延长③步的反应时间到 60min 后或更长, 改变后的反应时间需代入计算公式重新计算。或适当加大样本量(如 100μL, 则试剂二相应减少), 则改变后的加样体积 V1 需代入计算公式重新计算。
2. 若起始值 A1 太大如超过 2 (如颜色较深的样本) 或△A 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 100μL, 则试剂二相应增加), 则改变后的加样体积 V2 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。

$$\text{TPS 活力 (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V4 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \times (V2 \div V3) \div (V1 \div \text{Cpr}) \div T \\ = 93.8 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

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。

$$\text{TPS 活力 (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V4 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \times (V2 \div V3) \div (W \times V1 \div V) \div T \\ = 93.8 \times \Delta A \div W$$

3、按细菌或真菌数量计算:

$$\text{TPS 活力} (\mu\text{g}/10^4\text{cell}) = [\Delta A \times V4 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \times (V2 \div V3) \div (500 \times V1 \div V) \div T \\ = 0.188 \times \Delta A$$

V---加入提取液体积, 1 mL;

V1---加入样本体积, 0.06mL;

V2---第③步的反应总体积, 0.3mL;

V3---第④步中所取上清液体积, 0.2mL;

V4---反应体系总体积, 7×10^{-4} L;

d---光径, 1cm;

ϵ ---NADH 摩尔消光系数, 6.22×10^3 L / mol / cm;

W---样本质量, g;

500---细菌或真菌总数, 500 万;

T---反应时间, 30min;

Cpr---蛋白浓度 (mg/mL), 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量测定试剂盒。