

## 海藻糖-6 磷酸合成酶 (TPS) 试剂盒说明书

(货号: ADS-F-HZT002-24 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<sup>+</sup>, 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°C保存	
试剂一	粉剂 1 支	4°C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°C保存	
试剂三	粉剂 1 支	4°C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 4 支	-20°C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°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	临用前甩几下使粉剂落入底部, 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	临用前甩几下使液体落入底部, 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、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°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<sup>4</sup>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°C)。  
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°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 380:40:40:20:20 比例配成混合液 (一枪加 500μL)  
(用多少配多少, 现配现用), 在 1mL 石英比色皿 (光径 1cm) 中依次加入：

试剂二	380	380
试剂三	40	40
试剂四	40	40
试剂五	20	20
试剂六	20	20
③的上清液	200	200
混匀, 35°C 下立即于 340nm 处读取各管吸光值 A1, 30min 后读取 A2。ΔA=(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 120μL, 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 100μL, 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。

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

### 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。

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

### 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;

V2---第③步的反应总体积, 0.3mL;

V4---反应体系总体积,  $7 \times 10^{-4}$  L;

$\epsilon$ ---NADH 摩尔消光系数,  $6.22 \times 10^3$  L / mol /cm;

500---细菌或真菌总数, 万;

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。

V1---加入样本体积, 0.06mL;

V3---第④步中所取上清液体积, 0.2mL;

d---光径, 1cm;

W---样本质量, g;

T---反应时间, 30min;