

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 有效期: 3 个月)

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°C保存	
试剂一	粉剂 1 支	4°C保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底 (可手动甩一甩); 2. 加入 0.9mL 蒸馏水溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂二	液体 32mL×1 瓶	4°C保存	
试剂三	粉剂 1 瓶	4°C保存	1. 开盖前注意使粉剂落入底部 (可手动甩一甩); 2. 加入 2.2mL 蒸馏水溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂四	粉剂 4 支	-20°C保存	每支: 1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底 (可手动甩一甩); 2. 分别加 0.55mL 蒸馏水溶解备用; 3. 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	每支: 1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底 (可手动甩一甩); 2. 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	每支: 1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底 (可手动甩一甩); 2. 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:

研钵 (匀浆机)、冰盒 (制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅 (烘箱、培养箱、金属浴)、1ml 比色皿、离心管、分光光度计、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

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），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 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℃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。

TPS 活力(nmol/min/mg prot)=[ΔA×V4÷(ε×d)×10⁹]×(V2÷V3)÷(V1÷Cpr)÷T=93.8×ΔA÷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。

TPS 活力(nmol/min/g 鲜重)=[ΔA×V4÷(ε×d)×10⁹]×(V2÷V3)÷(W×V1÷V)÷T=93.8×ΔA÷W

3、按细菌或真菌数量计算：

$$\text{TPS 活力}(\mu\text{g}/10^4\text{cell})=[\Delta A \times V_4 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \times (V_2 \div V_3) \div (500 \times V_1 \div V) \div T = 0.188 \times \Delta A$$

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, 7×10^{-4} L;

ϵ ---NADH 摩尔消光系数, 6.22×10^3 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;