

海藻糖-6 磷酸合成酶（TPS）试剂盒说明书

（微板法 48 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 60mL×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 0.6mL 蒸馏水溶解备用。
试剂二	液体 19mL×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 1.5mL 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 0.3mL 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：

酶标仪、96 孔板、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 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 340nm。

② 所有试剂解冻至室温（25℃）。

③ 在 EP 管中依次加入：

试剂名称（ μ L）	测定管	对照管
样本	20	20
试剂一	10	

试剂二	70	80
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 96 孔板中依次加入:

试剂二	110	110
试剂三	10	10
试剂四	10	10
试剂五	10	10
③的上清液	60	60
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 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 40μL, 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 40μL, 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。

$$\text{TPS 活力 (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V4 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \times (V2 \div V3) \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T \\ = 178.6 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

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。

$$\text{TPS 活力 (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V4 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \times (V2 \div V3) \div (W \times V1 \div V) \div T \\ = 178.6 \times \Delta A \div W$$

3、按细菌或真菌数量计算:

$$\text{TPS 活力}(\mu\text{g}/10^4\text{cell}) = [\Delta A \times V4 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \times (V2 \div V3) \div (500 \times V1 \div V) \div T \\ = 0.357 \times \Delta A$$

V---加入提取液体积, 1 mL;

V1---加入样本体积, 0.02mL;

V2---第③步的反应总体积, 0.1mL;

V3---第④步中所取上清液体积, 0.06mL;

V4---反应体系总体积, 2×10^{-4} L;

d---96 孔板光径, 0.5cm;

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。