

6-磷酸海藻糖酯酶 (TPP) 试剂盒说明书

(货号: ADS-W-HZT003 微板法 48 样 有效期: 3 个月)

一、指标介绍:

6-磷酸海藻糖酯酶 (trehalose-6-phosphatephosphatase, TPP, EC3.1.3.12) 是海藻糖合成的关键酶之一, 催化海藻糖-6-磷酸生成海藻糖。

本试剂盒利用 6-磷酸海藻糖酯酶催化底物 6-磷酸海藻糖生成海藻糖, 海藻糖在海藻糖酶的作用下分解成葡萄糖, 接着在葡萄糖氧化酶作用下与特异显色剂反应生成有色物质, 通过检测该有色物质在 520nm 处的值, 即可得出的 6-磷酸海藻糖酯酶活性大小。

二、试剂盒组成和配制:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 60mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	液体 8mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂二	粉剂 1 支	-20℃ 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 1.1mL 蒸馏水溶解备用; 3. 用不完的试剂分装后-20℃ 保存, 尽量不要反复冻融。
试剂三	液体 1mL ×1 支	-20℃ 避光保存	1. 若该试剂一次性用不完, 则可分装后-20℃ 保存, 尽量不要反复冻融。
试剂四	粉剂 1 支	-20℃ 避光保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底 (可手动甩一甩); 2. 再加入 1.1mL 蒸馏水溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂五	液体 15mL×1 瓶	4℃ 保存	
标准品	粉体 1 支	4℃ 保存	1. 若重新做标曲, 则用到该试剂; 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制; 3. 溶解后的标品一周内用完。

三、实验器材:

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)、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

四、6-磷酸海藻糖酯酶 (TPP) 活性测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本 (例如不同类型或分组) 进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

1、样本提取:

- ① 组织样本: 称取约 0.1g 组织样本 (水分足的样本可取 0.5g), 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。

- ③ 液体样本: 澄清的液体样本, 可直接检测。若浑浊, 离心后取上清检测。

2、检测步骤：

- ① 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 520nm，所有试剂解冻至室温（25℃）。
- ② 在 EP 管中依次加入：

试剂组分 (μL)	测定管	对照管
样本	20	20
试剂一	60	80
试剂二	20	
混匀，37℃孵育 30min 后，立即沸水浴或金属浴 5min 拿出。冷却至室温后再继续添加试剂。		
试剂三	10	10
混匀，37℃孵育 15min。室温下于 12000rpm 离心 10min，上清液待检测。		

- ③ 在 96 孔板中依次加入：

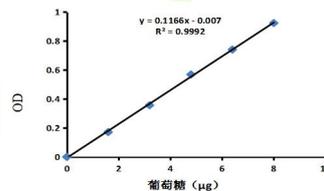
试剂组分 (μL)	测定管	对照管
上步待测液	40	40
试剂四	10	10
试剂五	150	150
混匀，37℃避光孵育 20min，520nm 下读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ (每个样本做一个自身对照)。		

【注】1.若 A 测定大于 1.5，可对③步的上清液用蒸馏水稀释，则稀释倍数 D 代入公式计算。

2.若 ΔA 差值在零附近，可增加②步中样本的体积 V1（如增至 40μL，则试剂一相应减少），则改变后的 V1 需代入公式重新计算。

五、结果计算：

1、标准曲线方程为 $y = 0.1166x - 0.007$ ；x 为标准品质量 (μg)，y 为 ΔA 。



2、按照蛋白浓度计算：

酶活定义：每毫克组织蛋白在每小时催化产生 1μg 葡萄糖定义为一个酶活力单位。

$$TPP(\mu\text{g}/\text{h}/\text{mg prot}) = [(\Delta A + 0.007) \div 0.1166 \times (0.11 \div 0.04)] \div (V1 \times Cpr) \div T = 2358.5 \times (\Delta A + 0.007) \div Cpr$$

3、按样本鲜重计算：

酶活定义：每克组织每小时催化产生 1μg 葡萄糖定义为一个酶活力单位。

$$TPP(\mu\text{g}/\text{h}/\text{g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.007) \div 0.1166 \times (0.11 \div 0.04)] \div (W \times V1 \div V) \div T = 2358.5 \times (\Delta A + 0.007) \div W$$

4、按细菌或真菌密度计算：

酶活定义：每 1 万个细菌或真菌每小时催化产生 1μg 葡萄糖定义为一个酶活力单位。

$$TPP(\mu\text{g}/\text{h}/10^4\text{cell}) = [(\Delta A + 0.007) \div 0.1166 \times (0.11 \div 0.04)] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 4.72 \times (\Delta A + 0.007)$$

5、按液体体积计算：

酶活定义：每毫升液体每小时催化产生 1μg 葡萄糖定义为一个酶活力单位。

$$TPP(\mu\text{g}/\text{h}/\text{mL}) = [(\Delta A + 0.007) \div 0.1166 \times (0.11 \div 0.04)] \div V1 \div T = 2358.5 \times (\Delta A + 0.007)$$

V--提取液体积，1 mL；V1--样本体积：0.02mL；W--样本质量，g；T--反应时间，0.5 小时；

500--细菌或真菌数量, 500 万; 0.11--第②步反应的总体积; 0.04--第③步反应上清液体积;

Cpr--样本蛋白质浓度, mg/mL; 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。

附: 标准曲线制作过程:

- 1 制备标准品母液 (1mg/mL): 从标准品管中称量取出 2mg 至一新 EP 管中, 再加 2mL 蒸馏水混匀溶解即 1mg/mL 的葡萄糖 (母液需在两天内用且-20°C保存)。
- 2 把母液用蒸馏水稀释成以下浓度: 0, 0.04,0.08,0.12,0.16, 0.2mg/mL。
- 3 第③步显色反应阶段检测: 40 μ L 标准品+10 μ L 试剂四+150 μ L 试剂五, 37°C避光孵育 20min, 520nm 下读取吸光值 A。依据结果制作标准曲线。