

6-磷酸海藻糖酯酶（TPP）试剂盒说明书

（货号：ADS-F-HZT003 分光法 24 样 有效期：3 个月）

一、产品简介：

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：

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 30mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 9mL×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 瓶	-20℃避光保存	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。
试剂五	液体 30mL×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、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，了解样品和熟悉实验流程，避免样本和试剂浪费！

1、样本制备：

- ① 组织样本：称取约 0.1g 组织样本（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：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 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 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、上机检测：

- ① 可见分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 520nm，蒸馏水调零。
- ② 所有试剂解冻至室温（25℃），在 EP 管中依次加入：

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
样本	40	40
试剂一	120	160
试剂二	40	
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	20	20
混匀，37℃孵育 15min。室温下于 12000rpm 离心 10min，上清液待检测。		

- ③ 在 EP 管中依次加入：

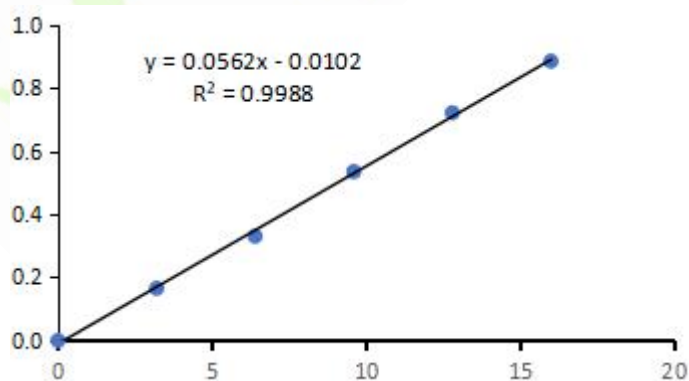
试剂名称 (μL)	测定管	对照管
上步待测液	80	80
试剂四	40	40
试剂五	600	600
混匀，37℃避光孵育 20min，全部液体转移至 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中，520nm 下读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ （每个样本做一个自身对照）。		

【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 80μL，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 $y = 0.0562x - 0.0102$ ；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。

$$TPP(\mu\text{g/h/mgprot}) = [(\Delta A + 0.0102) \div 0.0562 \times (0.22 \div 0.08)] \div (V1 \times Cpr) \div T = 2446.6 \times (\Delta A + 0.0102) \div Cpr$$

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。

$$TPP(\mu\text{g/h/g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0102) \div 0.0562 \times (0.22 \div 0.08)] \div (W \times V1 \div V) \div T = 2446.6 \times (\Delta A + 0.0102) \div W$$

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。

$$TPP(\mu\text{g/h}/10^4\text{cell}) = [(\Delta A + 0.0102) \div 0.0562 \times (0.22 \div 0.08)] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 4.9 \times (\Delta A + 0.0102)$$

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。

$$TPP(\mu\text{g/h/mL})=[(\Delta A+0.0102)\div 0.0562\times(0.22\div 0.08)]\div V1\div T=2446.6\times(\Delta A+0.0102)$$

V--提取液体积，1 mL； V1--样本体积：0.04mL； 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； 0.22--第②步反应的总体积； 0.08--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 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℃保存）。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0，0.04,0.08,0.12,0.16, 0.2mg/mL。也可根据实际样本调整标准品浓度。
- 2 标品稀释参照表如下：

吸取标准品母液 200uL，加入 800uL 蒸馏水，混匀得到 0.2mg/mL 的标品稀释液待用。						
标品浓度 mg/mL	0	0.04	0.08	0.12	0.16	0.2
标品稀释液 uL	0	40	80	120	160	200
水 uL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

- 3 依据显色反应阶段测定管加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。

试剂名称 (μL)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	80	
蒸馏水		80
试剂四	40	40
试剂五	600	600
37℃避光孵育 20min，520nm 下读取吸光值 A， ΔA=A 测定-0 浓度管。		