

6-磷酸海藻糖酯酶（TPP）试剂盒说明书

（货号：BP10282W 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、指标测定：

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：

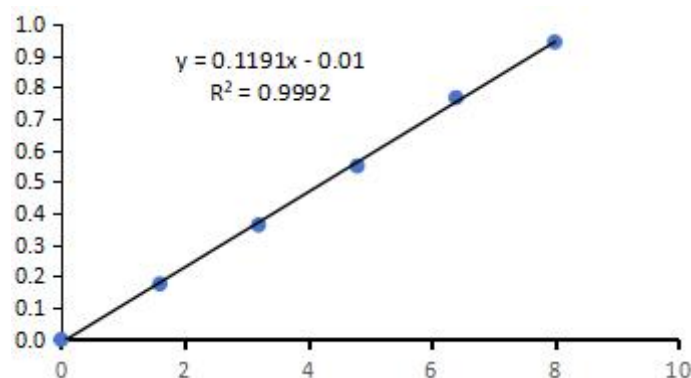
试剂组分 (μL)	测定管	对照管
上步待测液	40	40
试剂四	10	10
试剂五	150	150
混匀，37℃避光孵育 20min，520nm 下读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ (每个样本做一个自身对照)。		

【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 $y = 0.1191x - 0.01$ ；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。

$$TPP(\mu\text{g/h/mg prot}) = [(\Delta A + 0.01) \div 0.1191 \times (0.11 \div 0.04)] \div (V1 \times Cpr) \div T = 2309 \times (\Delta A + 0.01) \div Cpr$$

- 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。

$$TPP(\mu\text{g/h/g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.01) \div 0.1191 \times (0.11 \div 0.04)] \div (W \times V1 \div V) \div T = 2309 \times (\Delta A + 0.01) \div W$$

- 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。

$$TPP(\mu\text{g/h}/10^4\text{cell}) = [(\Delta A + 0.01) \div 0.1191 \times (0.11 \div 0.04)] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 4.62 \times (\Delta A + 0.01)$$

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。

$$TPP(\mu\text{g/h/mL})=[(\Delta A+0.01)\div 0.1191\times(0.11\div 0.04)]\div V1\div T=2309\times(\Delta A+0.01)$$

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 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	40	
蒸馏水		40
试剂四	10	10
试剂五	150	150
37℃避光孵育 20min，520nm 下读取吸光值 A， ΔA=A 测定-0 浓度管。		