

植物磷酸丙糖异构酶 (Triose-phosphate isomerase, TPI) 试剂盒说明书 (紫外分光法 48 样)

一、产品简介：

植物叶绿体中磷酸丙糖异构酶 (EC 5.3.1.1, TPI 或 TIM) 是光合作用中参与 calvin 循环的重要酶。磷酸二羟丙酮能快速透过叶绿体的包膜进入细胞质, 并在其中逐步转化为蔗糖。

TPI 转化磷酸二羟丙酮转化为甘油醛 3-磷酸, 接着与酶混合物作用, 伴随着 NADH 的生成, 通过检测 NADH 在 340nm 处的增加速率, 进而计算出 TPI 酶活性大小。

二、试剂盒的组成和配制：

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液一	液体 60mL×1 瓶	4℃ 保存	
提取液二	液体 60mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	液体 μL×1 支	-20℃ 保存	用前先离心或甩几下使试剂落入底部, 再加 1.1mL 蒸馏水充分溶解。
试剂二	粉体 mg×1 支	-20℃ 保存	用前先离心或甩几下使试剂落入底部, 再加 1.1mL 蒸馏水充分溶解。
试剂三	液体:40mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂四	粉体 mg×1 支	-20℃ 保存	用前先离心或甩几下使试剂落入底部, 再加 1.1mL 蒸馏水充分溶解。

三、所需的仪器和用品：

紫外分光光度计、1mL 石英比色皿 (光径 1cm)、可调式移液器、天平、低温离心机、研钵、震荡仪。

四、磷酸丙糖异构酶 (TPI) 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 总TPI酶提取: 建议称取约0.1g样本, 加入1mL提取液二进行冰浴匀浆, 于4℃, 13000rpm 离心5min, 取上清液测定。

② 胞浆和叶绿体 TPI 酶的分离:

称取约0.2g样本, 加入1mL提取液一, 冰浴匀浆后于4℃, 1600rpm离心5min, 弃沉淀, 取上清在4℃, 5000rpm离心15min, 取上清用于测定胞浆TPI酶活性, 沉淀留用。

取上述沉淀加1mL提取液二, 强力涡旋震荡15s, 置于冰上(或冰箱)孵育15min, 在4℃, 13000rpm离心5min, 取上清测定叶绿体中TPI酶活性。

【注】: a、测定总 TPI 酶活性, 按照步骤①提取粗酶液, 若需要分别测定胞浆和叶绿体中的 TPI, 则按照步骤②提取粗酶液。

b、整个叶绿体的提取过程须保持4℃低温环境。

2、上机检测：

① 紫外分光光度计预热 30min, 调节波长至 340nm, 设定温度 25℃, 蒸馏水调零。

② 所有试剂刚从冰箱里面拿出需先解冻至室温 (25℃)。

③ 在 1mL 石英比色皿中依次加入：

试剂名称 (μL)	样本管
样本	40
试剂一	20
试剂二	20
试剂三	600
试剂四	20
轻轻混匀，于 340nm 处检测，10s 读取 A1，10min 后读取 A2， $\Delta A=A2-A1$ 。	

【注】若 ΔA 在零附近徘徊，可以延长反应时间 T（如 30min），或者加大样本量 V1（如增至 80μL，则试剂三相应减少），则改变后的反应时间 T 和样本量 V1 代入计算公式重新计算。

五、结果计算：

1、按照样本蛋白浓度计算

酶活定义：每毫克组织蛋白每分钟生成 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{TPI (nmol/min/mg prot)} &= [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T \\ &= 281.4 \times \Delta A \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

2、按照样本质量计算

酶活定义：每克组织每分钟生成 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{TPI (nmol/min/g 鲜重)} &= [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T \\ &= 281.4 \times \Delta A \div W \end{aligned}$$

V---加入提取液体积，1 mL；

V1---加入样本体积，0.04mL；

V2---反应体系总体积， 7×10^{-4} L；

d---光径，1cm；

ϵ ---NADPH 摩尔消光系数， 6.22×10^3 L / mol / cm；

W---样本质量，g；

T---反应时间，10min；

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。