

植物磷酸丙糖异构酶（TPI）试剂盒说明书

（货号：ADS-W-T012-96 微板法 96 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 100mL×1 瓶	4℃保存	
提取液二	液体 100mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 1 支	-20℃保存	用前先离心或用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 1 支	-20℃保存	用前先离心或用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 20mL×1 瓶	4℃保存	
试剂四	液体 1 支	-20℃保存	用前先离心或用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：

酶标仪、96 孔板、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再次离心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，弃沉淀，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 酶标仪预热 30min，调节波长至 340nm，设定温度 25℃。

② 所有试剂刚从冰箱里面拿出需先解冻至室温（25℃）。

③ 在 96 孔板中依次加入：

试剂名称 (μL)	测定管
样本	10
试剂一	10
试剂二	10
试剂三	160
试剂四	10
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 20μL, 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。

$$\begin{aligned} \text{TPI (nmol/min/mg prot)} &= [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T \\ &= 643.1 \times \Delta A \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

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。

$$\begin{aligned} \text{TPI (nmol/min/g 鲜重)} &= [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T \\ &= 643.1 \times \Delta A \div W \end{aligned}$$

V---加入提取液体积, 1 mL;

V1---加入样本体积, 0.01mL;

V2---反应体系总体积, 2×10^{-4} L;

d---96 孔板光径, 0.5cm;

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。