

磷酸丙糖异构酶（Triose-phosphate isomerase, TPI）试剂盒说明书

（货号：BP10255F 分光法 48 样 有效期：3 个月）

一、指标介绍：

磷酸丙糖异构酶（EC 5.3.1.1, TPI 或 TIM）是糖酵解的重要酶。使磷酸甘油醛和磷酸二羟丙酮之间互相转化，从而维持这两种磷酸酯的平衡。TPI 可将糖酵解与戊糖磷酸途径和脂质代谢连接起来，且是一种几乎存在于所有生物中的稳定同型二聚体。

本试剂盒提供一种快速、简单且灵敏的检测方法，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，同时与特异显色探针反应生成在 450nm 处有最大吸收峰的物质。通过检测 450nm 处光吸收增加量即可得到 TPI 酶活性大小。

二、试剂盒的组成和配制：

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 1 支	-20℃保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底； 2. 加入 1.1mL 蒸馏水充分溶解； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂二	粉体 1 支	-20℃保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底； 2. 加入 1.1mL 蒸馏水充分溶解； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂三	液体 1mL×1 支	4℃避光保存	
试剂四	液体 40mL×1 瓶	4℃保存	
试剂五	粉体 1 支	-20℃保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底； 2. 加入 1.1mL 蒸馏水充分溶解； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
标准品	粉体 1 支	-20℃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）、1ml 比色皿、离心管、分光光度计、震荡仪、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 0.1g 组织样本，加入 1mL 提取液进行冰浴匀浆，于 4℃，12000rpm 离心 10min，取上清液测定。

【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/细胞样本：

先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；取约 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液，超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；12000rpm 4℃ 离心 10min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照细菌/细胞数量（10⁴）：提取液（mL）为 500~1000：1 的比例进行提取。

2、检测步骤：

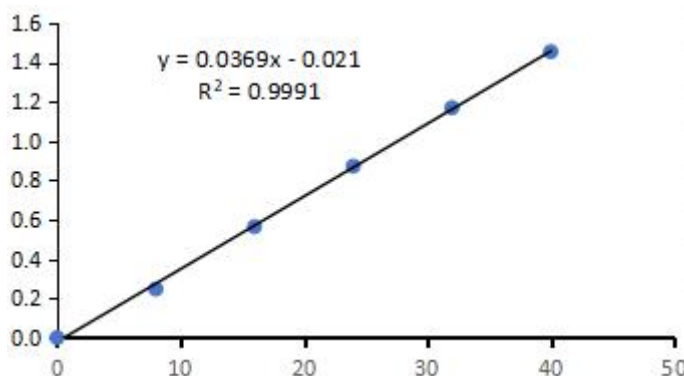
- ① 分光光度计预热 30min，调节波长至 450nm，设定温度 25℃，蒸馏水调零。
- ② 所有试剂刚从冰箱里面拿出需先解冻至室温（25℃）。
- ③ 在 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中依次加入：

试剂组分（μL）	样本管
样本	40
试剂一	20
试剂二	20
试剂三	20
试剂四	680
试剂五	20
轻轻混匀，于 450nm 处检测，20s 读取 A1，10min 后读取 A2， $\Delta A = A2 - A1$ 。	

- 【注】1. 若 ΔA 在零附近徘徊，可以延长反应时间（如 30min），或者加大样本量（如：80μL），则试剂四相应减少。
2. 若样本自身背景值较高，可设置一个自身对照（即试剂五用蒸馏水替代，其他不变）， $\Delta A = \Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{对照}}$ 。

五、结果计算：

- 1、标准曲线方程： $y = 0.0369x - 0.021$ ，x 是标准品摩尔质量（nmol），y 是 ΔA 。



- 2、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。

$$TPI(\text{nmol/min/mg prot}) = (\Delta A + 0.021) \div 0.0369 \div (V1 \times Cpr) \div T = 67.8 \times (\Delta A + 0.021) \div Cpr$$

- 3、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。

$$TPI(\text{nmol/min/g 鲜重}) = (\Delta A + 0.021) \div 0.0369 \div (W \times V1 \div V) \div T = 67.8 \times (\Delta A + 0.021) \div W$$

- 4、按细菌/细胞数量计算：

酶活定义：每 10⁴ 个细胞每分钟生成 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$TPI(\text{nmol/min/10}^4 \text{ cell}) = (\Delta A + 0.021) \div 0.0369 \div (500 \times V1 \div V) \div T = 67.8 \times (\Delta A + 0.021) \div 500$$

V---加入提取液体积, 1mL; V1---加入样本体积, 0.04mL;
 T---反应时间, 10 min; W---样本质量, g;
 500---细胞数量, 万;
 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 向标准品 EP 管里面加入 1.41ml 蒸馏水 (母液需在两天内用且-20℃保存), 标准品母液浓度为 1nmol/μL。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品, 例如: 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1 nmol /μL。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:

标品浓度 nmol /μL	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1
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
试剂一	20	20
试剂二	20	20
试剂三	20	20
试剂四	680	680
试剂五	20	20
轻轻混匀, 于 450nm 处检测, $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{0 浓度管}}$ 。		