

植物磷酸丙糖异构酶（TPI）试剂盒说明书

（货号：BP10255W-96 微板法 96 样 有效期：3 个月）

一、指标介绍：

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：

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
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	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 20mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂四	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。

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、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 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、检测步骤：

- 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：

试剂组分 (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，6.22×10³ 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。