



磷酸丙糖异构酶活性检测试剂盒

TPI Assay Kit

微量法

产品编号: AK507M

产品规格: 100T/96S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
ES507-1	100mL×1 瓶	4℃保存;
ES507-2	100mL×1 瓶	4℃保存;
AK507-A	12mL×1 瓶	4℃保存;
AK507-B	粉剂×1 瓶	-20℃避光保存。临用前加 2mL 蒸馏水充分溶解; 用不完的试剂分装后-20℃保存, 禁止反复冻融。
AK507-C	粉剂×1 瓶	-20℃避光保存。临用前加 2mL 蒸馏水充分溶解; 用不完的试剂分装后-20℃保存, 禁止反复冻融。
AK507-D	粉剂×1 瓶	-20℃避光保存。临用前加 2mL 蒸馏水充分溶解; 用不完的试剂分装后-20℃保存, 禁止反复冻融。

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介:

意义: 植物叶绿体中磷酸丙糖异构酶 (Triose-phosphate isomerase, TPI) 是光合作用中参与 calvin 循环的重要酶。作用于磷酸甘油醛和磷酸二羟丙酮之间的转化, 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。

原理: 磷酸丙糖异构酶将磷酸二羟丙酮转化为 3-磷酸甘油醛, 3-磷酸甘油醛与 NAD 在 3-磷酸甘油醛脱氢酶的作用下生成 3-磷酸甘油酸和 NADH, 340nm 处的吸光度变化反映了磷酸丙糖异构酶的活性的高低。

自备用品:

紫外分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔板 (UV 板)、天平、低温离心机、研钵、震荡仪。

酶液提取

- 总 TPI 酶提取:** 建议称取约 0.1g 样本, 加入 1mL ES507-1, 冰浴匀浆后超声破碎 (冰浴, 200W, 破碎 3s, 间歇 7s, 总时间 1min), 然后 4℃, 8000g 离心 10min, 取上清测定。
- 胞浆和叶绿体 TPI 酶的分离:** 按照植物组织质量 (g): 提取液体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 样本, 加入 1mL ES507-1), 冰浴匀浆后于 4℃, 200g 离心 5min, 弃沉淀, 取上清在 4℃, 8000g 离心 10min, 取上清用于测定胞浆 TPI 酶活性, 取沉淀加 1mL ES507-2, 震荡溶解后超声破碎 (冰浴, 200W, 破碎 3s, 间歇 7s, 总时间 1min), 然后 4℃, 8000g 离心 10min, 取上清测定叶绿体中 TPI 酶活性。
- 建议测定总 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。**

测定步骤:

- 分光光度计/酶标仪预热 30min, 调节波长至 340nm, 蒸馏水调零。
- 按下表依次加入:

试剂名称	测定管 (ul)
AK507-A	120
AK507-B	20
AK507-C	20

AK507-D	20
粗酶液	20
充分混匀, 立即记录 340nm 处 20s 的吸光值 A1, 然后快速置于 37°C 水浴锅或培养箱 5min, 拿出迅速擦干并测定 5min20s 时的吸光值 A2, 计算 $\Delta A = A2 - A1$ 。	

计算公式:

a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

1. 按照样本蛋白浓度计算

酶活单位定义: 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。

$$TPI (U/mg \text{ prot}) = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 321.54 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

2. 按照样本质量计算

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

$$TPI (U/g \text{ 鲜重}) = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 321.54 \times \Delta A \div W$$

注: V 反总: 反应体系总体积, 0.2mL; ϵ : NADH 摩尔消光系数, $6.22 \times 10^3 \text{ L} / \text{mol} / \text{cm}$; d: 比色皿光径, 1cm; V 样: 加入样本体积, 0.02mL; V 样总: 加入提取液体积, 1mL; T: 反应时间, 5 min; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量, g。

b. 用 96 孔板测定的计算公式如下

1. 按照样本蛋白浓度计算

酶活单位定义: 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。

$$TPI (U/mg \text{ prot}) = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 643.08 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

2. 按照样本质量计算

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

$$TPI (U/g \text{ 鲜重}) = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 643.08 \times \Delta A \div W$$

注: V 反总: 反应体系总体积, 0.2mL; ϵ : NADH 摩尔消光系数, $6.22 \times 10^3 \text{ L} / \text{mol} / \text{cm}$; d: 比色皿光径, 0.5cm; V 样: 加入样本体积, 0.02mL; V 样总: 加入提取液体积, 1mL; T: 反应时间, 5 min; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量, g。