

磷酸丙糖异构酶（TPI）活性检测试剂盒说明书

紫外分光光度法

注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。

货号：BC2260

规格：50T/48S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液一	液体 60mL×1 瓶	2-8℃保存
提取液二	液体 60mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 35mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	粉剂×2 瓶	-20℃保存
试剂三	粉剂×2 瓶	-20℃保存
试剂四	粉剂×3 支	-20℃保存

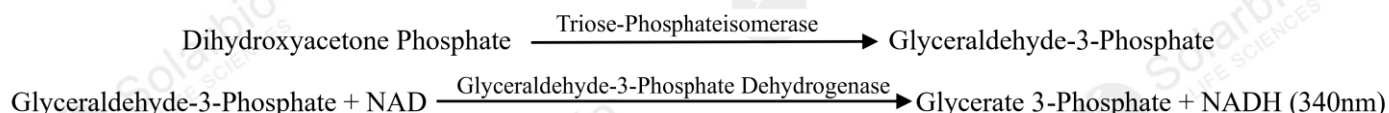
溶液的配制：

- 1、试剂二：临用前取 1 瓶加入 3mL 蒸馏水，充分溶解；用不完的试剂-20℃分装保存 4 周，避免反复冻融；
- 2、试剂三：临用前取 1 瓶加入 3mL 蒸馏水，充分溶解；用不完的试剂-20℃分装保存 4 周，避免反复冻融；
- 3、试剂四：提供一个棕色试剂空瓶，临用前取一支试剂四加入 2.5mL 蒸馏水，充分溶解；用不完的试剂-20℃分装保存 2 周，避免反复冻融。

产品说明：

植物叶绿体中磷酸丙糖异构酶（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。

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。



注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。

需自备的仪器和用品：

紫外分光光度计、天平、水浴锅、台式低温离心机、1mL石英比色皿、可调式移液枪、细胞超声破碎仪、研钵/匀浆器、冰、蒸馏水。

操作步骤：

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

1. 总 TPI 提取：按照组织质量（g）：提取液一（mL）为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g，加入 1mL 提取液一）进行冰浴匀浆，匀浆后冰浴超声波破碎（功率 200W，超声 3s，间隔 7s，总时间 1min），于 4℃，8000g 离心 10min，取上清，置于冰上待测。
2. 胞浆和叶绿体 TPI 的分离：





- (1) 按照组织质量(g):提取液一体积(mL)为1:5~10的比例(建议称取约0.1g,加入1mL提取液一)进行冰浴匀浆,匀浆后于4℃,200g离心5min,弃沉淀,留取上清。
- (2) 上清于4℃,8000g离心10min,取上清用于测定胞浆TPI活性,
- (3) 在第二步离心后的沉淀加1mL提取液二,震荡混匀后冰浴超声波破碎(功率200W,超声3s,间隔7s,总时间1min),然后4℃,8000g离心10min,取上清测定叶绿体中TPI活性。

注:1. 建议测定总TPI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。

2. 由于提取液一中含有一定浓度的蛋白(约0.5mg/mL),所以在测定样品蛋白浓度是需要减去提取液本身的蛋白含量(推荐使用双缩脲法测蛋白,不推荐使用BCA法)。

二、测定步骤

1. 紫外分光光度计预热30min以上,调节波长至340nm,蒸馏水调零。
2. 试剂一37℃预热15min以上。
3. 测定管:依次取600μL试剂一、100μL试剂二、100μL试剂三、100μL试剂四和100μL粗酶液于1mL石英比色皿,迅速吹打混匀,立即记录340nm处20s的吸光值A1,迅速置于37℃水浴锅或培养箱5min,拿出迅速擦干测定5min20s时的吸光值A2,计算 $\Delta A = A2 - A1$ 。

三、磷酸丙糖异构酶活性计算

1. 按样本蛋白浓度计算

酶活单位定义:每mg组织蛋白每min生成1nmol的NADH定义为一个酶活力单位。

$$\text{TPI 活性 (U/mg prot)} = (\Delta A \div \epsilon \div d) \times V_{\text{反}} \times 10^9 \div V_{\text{样}} \div \text{Cpr} \div T \times F = 321.54 \times \Delta A \div \text{Cpr} \times F$$

2. 按照样本质量计算

酶活单位定义:每g组织每min生成1nmol的NADH定义为一个酶活力单位。

$$\text{TPI 活性 (U/g 质量)} = (\Delta A \div \epsilon \div d) \times V_{\text{反}} \times 10^9 \div V_{\text{样}} \times V_{\text{提}} \div W \div T \times F = 321.54 \times \Delta A \div W \times F$$

ϵ : NADH 摩尔消光系数, $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$; d : 1mL 石英比色皿光径, 1cm; 10^9 : 单位换算系数, $1\text{mol} = 10^9\text{nmol}$;

$V_{\text{反}}$: 反应总体积, $1.0 \times 10^{-3} \text{ L}$; $V_{\text{样}}$: 加入样本上清体积, 0.1mL; $V_{\text{提}}$: 加入提取液一或提取液二的体积, 1mL;

W : 样本质量, g; Cpr : 样本蛋白浓度, mg/mL; T : 反应时间, 5min; F : 稀释倍数。

实验实例:

1. 称取0.11g绿萝叶片加入1mL提取液一进行匀浆研磨,超声破碎后离心取上清,按照测定步骤操作,用1mL石英比色皿测得计算 $\Delta A = A2 - A1 = 0.172 - 0.138 = 0.034$,按样本质量计算酶活得:
 $\text{TPI 活性 (U/g 质量)} = 321.54 \times 0.034 \div 0.11 = 99.39 \text{ U/g 质量}$ 。
2. 称取0.1033g玉兰叶片加入1mL提取液一进行匀浆研磨,超声破碎后离心取上清,按照测定步骤操作,用1mL石英比色皿测得计算 $\Delta A = A2 - A1 = 1.101 - 1.056 = 0.045$,按样本质量计算酶活得:
 $\text{TPI 活性 (U/g 质量)} = 321.54 \times 0.045 \div 0.1033 = 140.07 \text{ U/g 质量}$ 。

相关发表文献:

[1] Bai Y, Ren C, Hou C, Chen L, Wang Z, Li X, Zhang D. Phosphorylation and acetylation responses of glycolytic enzymes in meat to different chilling rates. Food Chem. 2023 Sep 30; 421:135896. doi: 10.1016/j.foodchem.2023.135896. Epub 2023 Mar 8. PMID: 37098310.

相关系列产品:

BC0530/BC0535 磷酸果糖激酶(PFK)活性检测试剂盒



本产品仅供科学研究使用。请勿用于临床、诊断、食品、化妆品检测等用途。

For research use only. Do not use for clinical, diagnostic, food, cosmetic testing and other purposes.



Solarbio®
LIFE SCIENCES

北京索莱宝科技有限公司
Beijing Solarbio Science & Technology Co.,Ltd.

- BC0540/BC0545 丙酮酸激酶（PK）活性检测试剂盒
BC0740/BC0745 己糖激酶（HK）活性检测试剂盒
BC2190/BC2195 磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶（PEPC）活性检测试剂盒
BC2210/BC2215 3-磷酸甘油醛脱氢酶（GAPDH）活性检测试剂盒



Tel: 400-968-6088 <https://www.solarbio.com> E-mail: sales-china@solarbio.com
Address: No. 85, Liandong U Valley, Middle Zone, 101102, Tongzhou Dist, Beijing, China