

植物磷酸丙糖异构酶 (TPI) 试剂盒说明书

(货号: ADS-F-T012-48 紫外分光法 48 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 60mL×1 瓶	4°C 保存	
提取液二	液体 60mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂一	液体 1 支	-20°C 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°C 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:40mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂四	液体 1 支	-20°C 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)、1ml 石英比色皿、离心管、紫外分光光度计、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 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°C, 13000rpm 离心 5min, 取上清液测定。

② 胞浆和叶绿体 TPI 酶分离:

称取约 0.2g 样本, 加入 1mL 提取液一, 冰浴匀浆后于 4°C, 1600rpm 离心 5min, 弃沉淀, 取上清在 4°C, 5000rpm 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°C, 13000rpm 离心 5min, 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 紫外分光光度计预热 30min，调节波长至 340nm，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 石英比色皿中依次加入：

试剂组分 (μL)	样本管
样本	40
试剂一	20
试剂二	20
试剂三	600
试剂四	20
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 80μL，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。

$$\begin{aligned} \text{TPI (nmol/min/mg prot)} &= [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T \\ &= 281.4 \times \Delta A \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

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。

$$\begin{aligned} \text{TPI (nmol/min/g 鲜重)} &= [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T \\ &= 281.4 \times \Delta A \div W \end{aligned}$$

V---加入提取液体积，1 mL；

V1---加入样本体积，0.04mL；

V2---反应体系总体积，7×10⁻⁴ L；

d---光径，1cm；

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。