

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

(货号: G0824F 分光法 48 样)

一、产品简介:

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:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 60mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂一	液体 μ L×1 支	-20°C 保存	用前先离心或甩几下使试剂落入底部, 再加 1.1mL 蒸馏水充分溶解。
试剂二	粉体 mg×1 支	-20°C 保存	用前先离心或甩几下使试剂落入底部, 再加 1.1mL 蒸馏水充分溶解。
试剂三	液体 1mL×1 支	4°C 保存	
试剂四	液体 40mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂五	粉体 mg×1 支	-20°C 保存	用前先离心或甩几下使试剂落入底部, 再加 1.1mL 蒸馏水充分溶解。
标准品	粉体 mg×1 支	-20°C 保存	若重新做标曲, 则用到该试剂。

三、所需的仪器和用品:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm)、可调式移液器、天平、低温离心机、研钵、震荡仪。

四、磷酸丙糖异构酶 (TPI) 活性测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

1、样本制备:

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°C, 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°C 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 (10^4): 提取液 (mL) 为 500~1000: 1 的比例进行提取。

2、上机检测:

① 可见分光光度计预热 30min, 调节波长至 450nm, 设定温度 25°C, 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°C)。

③ 在 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中依次加入：

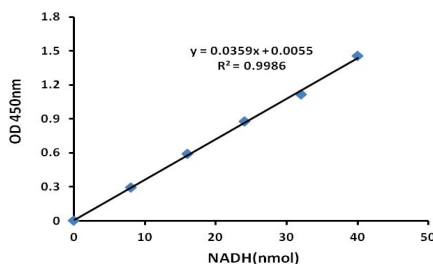
试剂名称（ μL ）	样本管
样本	40
试剂一	20
试剂二	20
试剂三	20
试剂四	680
试剂五	20

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：80 μL ），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： $y = 0.0359x + 0.0055$ ，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。

$$\text{TPI}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = (\Delta A - 0.0055) \div 0.0359 \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T = 69.6 \times (\Delta A - 0.0055) \div \text{Cpr}$$

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。

$$\text{TPI}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = (\Delta A - 0.0055) \div 0.0359 \div (W \times V1 \div V) \div T = 69.6 \times (\Delta A - 0.0055) \div W$$

4、按细菌/细胞数量计算：

酶活定义：每 10^4 个细胞每分钟生成 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{TPI}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) = (\Delta A - 0.0055) \div 0.0359 \div (500 \times V1 \div V) \div T = 69.6 \times (\Delta A - 0.0055) \div 500$$

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 制备标准品母液（1nmol/ μL ）：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 $^{\circ}\text{C}$ 保存）。
- 2 把母液稀释成六个浓度梯度的标准品：0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1. nmol / μL 。
- 3 依据加样表操作，根据结果即可制作标准曲线。