

磷酸丙糖异构酶 (Triose-phosphate isomerase, TPI)

试剂盒说明书

微量法 100T/96S

注意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

测定意义

植物叶绿体中磷酸丙糖异构酶是光合作用中参与 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。

测定原理

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。

自备实验用品及仪器

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

试剂组成和配制

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 12mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂二：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。

试剂三：粉剂×1 瓶，-20℃ 避光保存。临用前加 2 mL 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。

试剂四：粉剂×1 瓶，-20℃ 避光保存。临用前加 2 mL 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。

酶液提取

①**总 TPI 酶提取：**建议称取约 0.1g 样本，加入 1mL 提取液一，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。

②**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 提取液一），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 提取液二，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。

测定操作

1. 分光光度计/酶标仪预热 30min，调节波长至 340nm，蒸馏水调零。
2. 取微量石英比色皿/96 孔板，依次加入 120μL 试剂一，20μL 试剂二，20μL 试剂三，20μL 试剂四，20μL 粗酶液，充分混匀，记录 340nm 处 10s 的吸光值 A1 和 310s 的吸光值 A2， $\Delta A = A2 - A1$

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。

$$\text{TPI (nmol/min/mg prot)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 321.54 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(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。

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

V 反总：反应体系总体积，0.2mL； ϵ ：NADH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$ ；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。

$$\text{TPI (nmol/min/mg prot)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 643.08 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(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。

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

V 反总：反应体系总体积，0.2mL； ϵ ：NADH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$ ；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