

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

（微板法 96 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 100mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	液体 μL ×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 20mL×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：

酶标仪、96 孔板、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 酶标仪预热 30min，调节波长至 450nm，设定温度 25°C。

② 所有试剂刚从冰箱里面拿出需先解冻至室温（25°C）。

③ 在 96 孔板中依次加入：

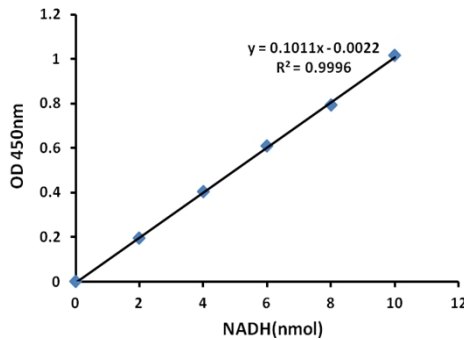
试剂名称（ μL ）	测定管
-----------------------	-----

样本	10
试剂一	10
试剂二	10
试剂三	10
试剂四	150
试剂五	10
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：20 μ L），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）， $\Delta A=\Delta A$ 测定- ΔA 对照。

五、结果计算：

- 1、标准曲线方程： $y = 0.1011x - 0.0022$ ，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。

$$TPI(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = (\Delta A + 0.0022) \div 0.1011 \div (V1 \times Cpr) \div T = 98.9 \times (\Delta A + 0.0022) \div Cpr$$

- 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。

$$TPI(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = (\Delta A + 0.0022) \div 0.1011 \div (W \times V1 \div V) \div T = 98.9 \times (\Delta A + 0.0022) \div W$$

- 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。

$$TPI(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) = (\Delta A + 0.0022) \div 0.1011 \div (500 \times V1 \div V) \div T = 98.9 \times (\Delta A + 0.0022) \div 500$$

V---加入提取液体积，1mL；

V1---加入样本体积，0.01mL；

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/ μ L）：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 $^{\circ}$ 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 / μ L。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 依据加样表操作，根据结果即可制作标准曲线。