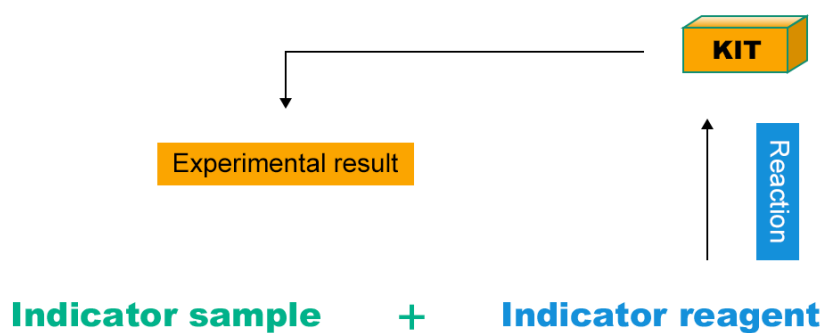


上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0491

Size: 100T/96S

磷酸丙糖异构酶 (TPI) 检测试剂盒说明书

微量法

*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

一、测定意义:

磷酸丙糖异构酶是重要的糖酵解酶, 广泛存在于动植物及微生物体内, 在机体内参与葡萄糖代谢, 在糖酵解, 糖异生、脂肪酸生物合成及磷酸戊糖代谢中都发挥着重要作用。

二、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。

三、需自备的仪器和用品:

天平、低温离心机、研钵、紫外分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96 UV 孔板 (ZC-1036)。

四、试剂的组成和配置:

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液	液体 100mL × 1 瓶	4°C 保存	
试剂一	液体 12mL × 1 瓶	4°C 避光保存	
试剂二	粉剂 × 1 瓶	-20°C 避光保存	临用前加 2mL 蒸馏水充分溶解
试剂三	粉剂 × 1 瓶	-20°C 避光保存	临用前加 2mL 蒸馏水充分溶解
试剂四	粉剂 × 1 瓶	-20°C 避光保存	临用前加 2mL 蒸馏水充分溶解

五、酶液提取

1. 组织：按照质量（g）：提取液体积（mL）为1：5~10的比例（建议称取约0.1g，加入1mL提取液）加入提取液，冰浴匀浆后于4℃，10000g 离心10min，取上清置冰上待测。
2. 细胞：按照细胞数量（10⁴个）：提取液体积（mL）为500~1000：1的比例（建议500万细胞加入1mL提取液），冰浴超声波破碎细胞（功率300w，超声3秒，间隔7秒，总时间3min）；然后 4℃，10000g 离心10min，取上清置冰上待测。
3. 液体：直接检测。

六、测定操作

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

七、计算公式

● 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1nmol的NADH定义为一个酶活力单位。

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

（2）按照样本质量计算

酶活单位定义：每克组织每分钟生成1nmol的NADH定义为一个酶活力单位。

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

(3) 按照细胞数量计算

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

$$\begin{aligned} \text{TPI (nmol/min/10}^4\text{cell)} &= \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{细胞数量} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 321.54 \times \Delta A \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

(4) 按照液体体积计算

酶活单位定义：每毫升液体每分钟生成1nmol的NADH定义为一个酶活力单位。

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

V反总：反应体系总体积，0.2mL； ϵ ：NADH 摩尔消光系数， 6.22×10^3 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

● 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1nmol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1nmol的NADH定义为一个酶活力单位。

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

(3) 按照细胞数量计算

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

$$\begin{aligned} \text{TPI (nmol/min/10}^4\text{cell)} &= \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{细胞数量} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 643.08 \times \Delta A \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

(4) 按照液体体积计算

酶活单位定义：每毫升液体每分钟生成1nmol的NADH定义为一个酶活力单位。

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

$V_{\text{反总}}$ ：反应体系总体积，0.2mL； ϵ ：NADH 摩尔消光系数， 6.22×10^3 L/mol/cm； d ：比色皿光径，0.5cm； $V_{\text{样}}$ ：加入样本体积，0.02mL； $V_{\text{样总}}$ ：加入提取液体积，1mL； T ：反应时间，5 min； C_{pr} ：样本蛋白质浓度，mg/mL； W ：样本质量，g

八、注意事项

配制好的试剂二、试剂三、试剂四3天内使用完。