

# 磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶（PEPC）活性检测试剂盒 （微量法）

产品货号：BA1211

产品规格：100管/96样

## 产品简介：

磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶（EC 4.1.1.31）广泛存在于植物和微生物中，是催化磷酸烯醇式丙酮酸与二氧化碳反应生成草酰乙酸呈不可逆反应的酶，同时也是C4植物和CAM植物固定CO<sub>2</sub>的关键酶，对三羧酸循环的运转起重要调节作用。

PEPC催化磷酸烯醇式丙酮酸和CO<sub>2</sub>生成草酰乙酸和HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup>，苹果酸脱氢酶进一步催化草酰乙酸和NADH生成苹果酸和NAD<sup>+</sup>，在340nm测定NADH减少速率，计算PEPC活性。

**注意：实验之前建议选择2-3个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。**

## 产品内容：

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体100mL×1瓶	2-8℃
试剂一	液体15mL×1瓶	2-8℃
试剂二	液体2mL×1瓶	2-8℃
试剂三	液体2mL×1瓶	2-8℃
试剂四	粉剂×1瓶	-20℃
试剂五	粉剂×1瓶	-20℃
试剂六原液	液体10 μ L×1瓶	2-8℃
试剂六稀释液	液体5mL×1瓶	2-8℃
试剂七	粉剂×1瓶	-20℃

## 溶液的配制：

1. 试剂四：临用前加入2mL双蒸水充分溶解待用；可分装后-20℃保存，避免反复冻融；
2. 试剂五：临用前加入2mL双蒸水充分溶解待用；可分装后-20℃保存，避免反复冻融；
3. 试剂六原液：液体置于试剂瓶内EP管中；
4. 试剂六工作液配制：将试剂六原液：试剂六稀释液=1.6μL：328.4μL稀释，用多少配多少；
5. 试剂七：临用前加入5mL双蒸水，用不完的试剂可分装后-20℃保存，避免反复冻融；
6. 工作液的配制：根据样本数量按体积比试剂二、试剂三、试剂四、试剂五、试剂六工作液、试剂七=15:15:15:15:19:19的比例混合。工作液现用现配。

## 需自备的仪器和用品：

紫外分光光度计/酶标仪、台式离心机、水浴锅、微量石英比色皿/96孔UV板、可调式移液枪、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水。

## 操作步骤：

### 一、粗酶液提取：



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q：807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com

1. 组织：按照组织质量（g）：提取液体积（mL）为1：5~10的比例（建议称取约0.1g组织，加入1mL提取液）进行冰浴匀浆，然后，8000g，4℃，离心20min。
2. 细菌或细胞：按照细菌或细胞数量（10<sup>4</sup>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8000g，4℃，离心20min，取上清置于冰上待测。

## 二、测定步骤：

1. 分光光度计/酶标仪预热30min以上，调节波长至340nm，蒸馏水调零。
2. 操作表：

试剂名称（μL）	测定管	空白管
试剂一	90	90
工作液	90	90
样本	20	-
蒸馏水	-	20

在微量石英比色皿/96孔UV板中分别加入上述试剂，充分混匀后于340nm处测定10s时的吸光值A1，迅速置于30℃水浴或培养箱5min（酶标仪有控温功能可将温度调至30℃），拿出迅速擦干测定310s时的吸光值A2，计算ΔA测定管=A1测定-A2测定，ΔA空白管=A1空白-A2空白，ΔA=ΔA测定管-ΔA空白管。空白管只需做一次。

## 三、PEPC酶活计算：

1. 按微量石英比色皿计算：

### （1）按蛋白浓度计算

酶活定义：每mg组织蛋白在反应体系中每分钟消耗1nmol NADH定义为一个酶活力单位。

$$\text{PEPC 酶活 (U/mg prot)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T$$

$$= 321 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

### （2）按样本质量计算

酶活定义：每g组织在反应体系中每分钟消耗1nmol NADH定义为一个酶活力单位。

$$\text{PEPC 酶活 (U/g 鲜重)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times W \div V_{\text{样总}}) \div T$$

$$= 321 \times \Delta A \div W$$

### （3）按细菌或细胞数量计算

酶活定义：每10<sup>4</sup>个细菌或细胞每分钟消耗1nmol NADH定义为一个酶活力单位。

$$\text{PEPC 酶活 (U/10}^4 \text{ cell)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{细胞数量 (万个)}) \div T$$

$$= 321 \times \Delta A \div \text{细胞数量 (万个)}$$

ε：NADH摩尔消光系数，6.22×10<sup>3</sup>L/ mol /cm；d：比色皿光径，1cm；V反总：反应体系总体积，2×10<sup>-4</sup>L；V样：反应体系中样本体积，0.02mL；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；W：样本质量，g；V样总：加入提取液体积，1mL；T：反应时间：5min；10<sup>9</sup>：单位换算系数，1mol=10<sup>9</sup>nmol。

2. 按96孔UV板计算：

将上述公式中的d-1cm改为d-0.6cm（比色皿光径）进行计算即可。

## 注意事项：

1. 为保证实验结果的准确性，需先取1-2个样做预实验，ΔA大于0.6时，建议将粗酶液用提取液稀释后再进行测定。当ΔA小于0.01时，可以延长反应时间（10min或15min）来测定。
2. 空白管为检测各试剂组分质量的检测孔，正常情况下，变化不超过0.01。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q：807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com