

# 丙酮酸磷酸双激酶（PPDK）活性检测试剂盒 （紫外分光光度法）

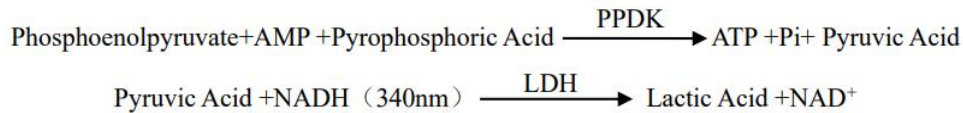
产品货号：BA2099

产品规格：50T/48S

## 产品简介：

丙酮酸磷酸双激酶（pyruvate phosphate dikinase, PPDK, EC 2.7.9.1）是C4途径和景天科酸代谢途径的限速酶，催化ATP、丙酮酸和Pi经三步反应生成磷酸烯醇式丙酮酸。该酶主要存在于C4植物的叶绿体基质中，对光合功能具有重要调节作用。

PPDK的逆向反应催化磷酸烯醇式丙酮酸（PEP）、AMP和PPi生成丙酮酸、ATP和Pi，乳酸脱氢酶（LDH）进一步催化丙酮酸和NADH生成乳酸和NAD<sup>+</sup>，在340nm测定NADH减少速率，据此可以计算PPDK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。

## 产品组成：

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体60mL×1瓶	2-8℃
试剂一	液体40mL×1瓶	2-8℃
试剂二	粉剂×1瓶	-20℃
试剂三	液体3mL×1瓶	2-8℃
试剂四	粉剂×1瓶	2-8℃
试剂五	粉剂×1瓶	-20℃
试剂六	液体120μL×1支	2-8℃

## 溶液的配制：

1. 试剂二：临用前加入3mL蒸馏水充分溶解，未用完的试剂-20℃分装保存4周，避免反复冻融。
2. 试剂四：临用前加入3mL蒸馏水充分溶解，未用完的试剂-20℃分装保存4周，避免反复冻融。
3. 试剂五：临用前加入3.1mL蒸馏水充分溶解，未用完的试剂-20℃分装保存4周，避免反复冻融。
4. 试剂六工作液：临用根据样本量按照试剂六：蒸馏水=20μL：480μL（共0.5mL，10T）的比例配制成，现配现用。
5. 工作液的配制：临用前按样本量将试剂二：试剂三：试剂四：试剂五：试剂六工作液=0.5mL：0.5mL：0.5mL：0.5mL：0.5mL（共2.5mL，约10T）配制成工作液使用，现配现用。

## 需自备的仪器和用品：

紫外分光光度计、1mL石英比色皿、天平、低温离心机、水浴锅、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水。

## 操作步骤：

### 一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

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。12000g，4℃离心10min，取上清置于冰上待测。



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

## 二、测定步骤

1. 紫外分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 340nm。蒸馏水调零。
2. 试剂一 37°C 预热 10min。
3. 样本测定（在 1mL 石英比色皿/1.5mL EP 管中加入下列试剂）

试剂名称 (μL)	空白管	测定管
试剂一	650	650
工作液	250	250
样本	-	100
提取液	100	-

在石英比色皿/1.5mL EP 管中分别加入上述试剂，充分混匀后记录 340nm 下 10s 时的初始吸光度 A1 空白、A1 测定，之后迅速将比色皿连同反应液一起置于 37°C 水浴中准确反应 5min，迅速取出比色皿并擦干，340nm 下记录 5min10s 时的吸光度 A 空白 2、A 测定 2，计算  $\Delta A \text{ 测定} = A \text{ 测定 1} - A \text{ 测定 2}$ ， $\Delta A \text{ 空白} = A \text{ 空白 1} - A \text{ 空白 2}$ ， $A = \Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}$ 。空白管只需做 1-2 次。

**注：**在 1.5mL EP 管中进行反应时，可参考以下步骤：先将比色皿置于分光光度计中，将反应液混匀后迅速加入 1mL 石英比色皿中，记录 340nm 下 10s 时的初始吸光度 A1 空白、A1 测定，之后迅速将反应液吸取到 1.5mL EP 管中，置于 37°C 水浴中准确反应 5min，迅速取出 EP 管并擦干，340nm 下记录 5min10s 时的吸光度 A2 空白、A2 测定。

## 三、丙酮酸磷酸双激酶 (PPDK) 计算公式

1. 按样本蛋白浓度计算：

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

$$\text{PPDK 活性 (U/mg prot)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反} \times 10^9 \div (\text{Cpr} \times V \text{ 样}) \div T \times F = 321.54 \times \Delta A \div \text{Cpr} \times F$$

2. 按样本蛋白质量计算：

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

$$\text{PPDK 活性 (U/g 质量)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反} \times 10^9 \div (W \div V \text{ 提取} \times V \text{ 样}) \div T \times F = 321.54 \times \Delta A \div W \times F$$

$\epsilon$ : NADH 摩尔消光系数,  $6.22 \times 10^3 \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{cm})$ ;  $d$ : 比色皿光径, 1cm;  $V \text{ 反}$ : 反应体系体积,  $1 \times 10^{-3} \text{ L}$ ;  $V \text{ 样}$ : 反应体系中加入的样本体积, 0.1mL;  $V \text{ 提取}$ : 加入提取液的体积, 1mL;  $T$ : 反应时间, 5min;  $\text{Cpr}$ : 样本蛋白浓度, mg/mL;  $W$ : 样本质量, g;  $F$ : 稀释倍数;  $10^9$ : 单位换算,  $1 \text{ mol} = 10^9 \text{ nmol}$ 。

### 注意事项：

1. 测定过程中样本和工作液在冰上放置，以免变性和失活。
2. 最好两个人同时做此实验，一个人比色，一个人计时，以保证实验结果的准确性。
3. 当样本  $\Delta A < 0.005$  时，可适当延长酶促反应时间或增大样本量后测定；当样本  $\Delta A > 0.6$  或 A1 测定  $<$  空白时，可用蒸馏水稀释上清液后测定，注意同步修改计算公式中的稀释倍数。



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