

磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶（PEPC）活性检测试剂盒说明书

产品货号	产品名称	包装规格	测定方法
PMHC1-M96	磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶（PEPC）活性检测试剂盒	96T	微量法

一、测定意义

磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶（PEPC）广泛存在于光合生物，还存在于很多非光合细菌和原生动物中，催化磷酸烯醇式丙酮酸与二氧化碳反应生成草酰乙酸和无机磷酸的不可逆反应。PEPC在植物细胞中参与植物的光合碳同化等重要代谢途径，并且在不同组织中具有多种生理作用。同时也参与调控植物种子的营养物质合成和代谢过程，控制糖类物质流向脂肪酸合成或者蛋白质合成途径。

二、测定原理

PEPC 催化磷酸烯醇式丙酮酸和 HCO_3^- 生成草酰乙酸，草酰乙酸在苹果酸脱氢酶催化下，可被NADH还原成苹果酸，通过在 340nm 测定反应体系吸光度的减少，可计算PEPC的活性。

三、试剂组成

试剂名称	试剂装量(96T)	保存条件
提取液	液体 110mL×1 瓶	4℃保存
试剂一	液体 20mL×1 瓶	4℃保存
试剂二	液体 2mL×1 瓶	4℃保存
试剂三	粉剂×1 瓶	-20℃保存
试剂三配制：临用前加入2 mL 蒸馏水充分溶解待用；分装后-20℃保存，避免反复冻融；		
试剂四	粉剂×1 瓶	-20℃保存
试剂四配制：临用前加入2 mL 蒸馏水充分溶解待用；分装后-20℃保存，避免反复冻融；		
试剂五	粉剂×1 瓶	4℃保存
试剂五配制：临用前加入2 mL 蒸馏水充分溶解待用，4℃密封保存；		
试剂六贮备液	液体 100μL×1 瓶	-20℃保存
试剂六稀释液	液体 2mL×1 瓶	4℃保存
试剂六配制：临用前按照贮备液：稀释液=1:20 比例配制，用多少配多少。		

四、操作步骤

样本前处理

取一定量植物组织擦净水分及杂质，剪碎后放入研钵，加入液氮，研磨成粉状后转移出来，然后准确称重，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），旋涡混匀抽提 3-5 分钟或者使用组织破碎仪冰浴提取，8000g，4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

测定步骤

- 1、紫外分光光度计/酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 340nm，蒸馏水调零。
- 2、工作液的配制：临用前每个样本将试剂一、试剂二、试剂三、试剂四、试剂五、试剂六按照 130 (μL) : 10 (μL) : 10 (μL) : 10 (μL) : 10 (μL) : 10 (μL) 的比例混匀，置于 30℃平衡 10min。
- 3、操作表（在微量石英比色皿/96 孔 UV 板（自备）中分别加入下列试剂）：

试剂名称(μL)	测定管	空白管
工作液	180	180
样本	20	-
蒸馏水	-	20

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（酶标仪有控温功能的可将温度调至 30℃），拿出迅速擦干测定 310s 时的吸光值 A2，

计算 $\Delta A_{\text{测定管}} = A1_{\text{测定}} - A2_{\text{测定}}$ ， $\Delta A_{\text{空白管}} = A1_{\text{空白}} - A2_{\text{空白}}$ ， $\Delta A = \Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}$ 。
 （空白管只需做 1-2 次）

五、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。

$$\text{PEPC (U/g FW)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times W \div V_{\text{样总}}) \div T = 321 \times \Delta A \div W$$

2、按96孔UV板计算：

将上述公式中的d-1cm 改为d-0.6cm（96孔板光径）进行计算即可。

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反总: 反应体系总体积， $2 \times 10^{-4} \text{ L}$ ；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；109: 单位换算系数， $1 \text{ mol} = 109 \text{ nmol}$ ；

六、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 0.3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、在波长 340nm 处测定吸光度的变化，需使用 UV 板或者微量石英比色皿。

七、公司介绍

陌凡生物科技有限公司是一家专业从事转基因检测、食品安全以及动植物疫病检测为核心业务的生物科技公司。能够为客户提供动植物疫病检测试剂、小分子抗原抗体、植物激素、植物抗体、重组蛋白等优质产品。自主研发了涵盖分子生物学、细胞生物学、免疫学、生物医学等领域的各种试剂盒。产品覆盖面广，品质可靠。