

磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 (PEPC) 活性检测试剂盒说明书

微量法

货号: AC10400

规格: 100T/96S

产品组成: 使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致, 有疑问请及时联系本公司工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 100 mL×1 瓶	4°C保存
试剂一	液体 15 mL×1 瓶	4°C保存
试剂二	液体 2 mL×1 瓶	4°C保存
试剂三	液体 2 mL×1 瓶	4°C保存
试剂四	粉剂×1 瓶	-20°C保存
试剂五	粉剂×1 瓶	-20°C保存
试剂六原液	液体 10 μL×1 支	4°C保存
试剂六稀释液	液体 5 mL×1 瓶	4°C保存
试剂七	粉剂×1 瓶	-20°C保存

溶液的配制:

- 1、试剂四: 临用前加入 2 mL 双蒸水充分溶解待用; 可分装后-20°C保存, 避免反复冻融;
- 2、试剂五: 临用前加入 2 mL 双蒸水充分溶解待用; 可分装后-20°C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 5 mL 双蒸水, 用不完的试剂可分装后-20°C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。

产品说明:

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 CO₂ 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 CO₂ 生成草酰乙酸和 HPO₄²⁻, 苹果酸脱氢酶进一步催化草酰乙酸和 NADH 生成苹果酸和 NAD⁺, 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。

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、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，然后，8000g，4℃，离心 20min。

2、细菌或细胞：按照细菌或细胞数量（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 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 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 1-2 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。

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

(3) 按细菌或细胞数量计算

酶活定义：每 10⁴ 个细菌或细胞每分钟消耗 1nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{PEPC 酶活 (U/10}^4 \text{ cell)} &= \Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{细胞数量 (万个)}) \div T \\ &= 321 \times \Delta A \div \text{细胞数量 (万个)} \end{aligned}$$

ε: NADH 摩尔消光系数, 6.22×10³L/ mol /cm; d: 比色皿光径, 1cm; V 反总: 反应体系总体积, 2×10⁻⁴L; V 样: 反应体系中样本体积, 0.02mL; C_{pr}: 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, 1mol=10⁹nmol。

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。

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。

实验实例：

1、取 0.1g 天竺葵加入 1mL 提取液进行匀浆研磨，取上清之后按照测定步骤操作，测得计算 ΔA 测定= A_1 测定- A_2 测定= $1.013-0.9753=0.0377$ ， ΔA 空白= A_1 空白- A_2 空白= $0.8407-0.8392=0.0015$ ， $\Delta A=\Delta A$ 测定- ΔA 空白= $0.0377-0.0015=0.0362$ ，按样本质量计算酶活：

PEPC 酶活 (U/g 质量) = $321 \times \Delta A \div W = 321 \times 0.0362 \div 0.1 = 116.202$ U/g 质量。

2、取 0.1g 芦荟加入 1mL 提取液进行匀浆研磨，取上清之后按照测定步骤操作，测得计算 ΔA 测定= A_1 测定- A_2 测定= $0.7049-0.6699=0.035$ ， ΔA 空白= A_1 空白- A_2 空白= $0.8407-0.8392=0.0015$ ， $\Delta A=\Delta A$ 测定- ΔA 空白= $0.035-0.0015=0.0335$ ，按样本质量计算酶活：

PEPC 酶活 (U/g 质量) = $321 \times \Delta A \div W = 321 \times 0.0335 \div 0.1 = 107.535$ U/g 质量。

参考文献：

[1] Zhang Y H, Wang Z M, Huang Q, et al. Phosphoenolpyruvate carboxylase activity in ear organs is related to protein concentration in grains of winter wheat[J]. Journal of cereal science, 2008, 47(2): 386-391.