

磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 (PEPC)试剂盒说明书

(货号: G0606W 微板法 96 样)

一、产品简介:

磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 (PEPC, EC 4.1.1.31) 是 C₄ 植物和 CAM 植物光合碳代谢的关键酶, 起着固定环境中 CO₂ 的作用。催化 PEP 和 CO₂ 羧化形成草酰乙酸的不可逆反应, 此酶在光合碳同化、呼吸作用和物质代谢等方面均有重要作用。

PEPC 催化磷酸烯醇式丙酮酸 (PEP) 和 CO₂ 生成草酰乙酸, 苹果酸脱氢酶进一步催化草酰乙酸和 NADH 生成苹果酸和 NAD⁺, 通过测定 NADH 在 340nm 下的减少速率, 即可计算出 PEPC 酶活性大小。

二、试剂盒的组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 100mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂一	粉剂 mg×2 支	-20°C 保存	用前甩几下或离心使试剂落入底部, 再加 1.1mL 蒸馏水溶解, 用不完的试剂分装后-20°C 保存, 禁止反复冻融, 三天内用完。
试剂二	液体 15mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂三	粉剂 mg×1 支	-20°C 保存	用前甩几下或离心使试剂落入底部, 再加 2.1mL 蒸馏水溶解备用。

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、台式离心机、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

四、磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 (PEPC)活性测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

1、样本制备:

① 组织样本:

称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆。12000rpm, 4°C 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 也可以按照组织质量 (g): 提取液体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例提取。

② 细胞样本:

先收集细胞到离心管内, 离心后弃上清; 取约 500 万细胞加入 1mL 提取液, 超声波破碎细胞 (冰浴, 功率 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次); 12000rpm 4°C 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照细胞数量 (10⁴): 提取液 (mL) 为 500~1000: 1 的比例进行提取。

2、上机检测:

① 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 340nm。

② 所有试剂解冻至室温 (25°C), 试剂二和三可按测定样本数量提前混合 (混合比例依据依据加样表) (现配现用)。

③ 在 96 孔板中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管
样本	20
试剂一	20
试剂二	140
试剂三	20
轻轻混匀, 室温 (25°C) 条件下, 于 340nm 处读取吸光值 A, 1min 后读取吸光值 A1, 15min 后读取 A2, ΔA=A1-A2。	

【注】 1. 若 ΔA 小于 0.01, 可以适当延长反应时间 T (由 15min 延长到 25min 后读取 A2); 或加大样本量 V1 (如增至 50μL, 则试剂二相应减少); 或增加样本取样质量 W, 则改变后的 T 和 V1 和 W 需代入计算公式重新计算。

2. 若起始值 A1 太大如超过 2 (如颜色较深的植物叶片, 一般色素较高, 则起始值相对会偏高), 可以适当减少样本加样量, 则改变后的加样体积需代入计算公式重新计算。或向待测样本中加少许活性炭混匀静置 5min 后 12000rpm, 4°C 离心 10min, 上清液用于检测;

3. 若 ΔA 大于 0.4, 则需减少反应时间 (如减少至 5min), 则改变后的反应时间 T 需代入计算公式重新计算。

4. 若下降趋势不稳定, 可以每隔 10S 读取一次吸光值, 选取一段线性下降的时间段来参与计算, 相对应的 A 值也代入计算公式重新计算。

五、结果计算:

1、按样本蛋白浓度计算:

酶活定义: 每毫克组织蛋白每分钟消耗 1nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$PEPC(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V2] \div (V1 \times Cpr) \div T = 214.4 \times \Delta A \div Cpr$$

2、按样本鲜重计算:

酶活定义: 每克组织每分钟消耗 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$PEPC(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V2] \div (W \times V1 \div V) \div T = 214.4 \times \Delta A \div W$$

3、按细胞数量计算:

酶活定义: 每百万细胞每分钟消耗 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$PEPC(\text{nmol}/\text{min}/10^6\text{cell}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V2] \div (5 \times V1 \div V) \div T = 214.4 \times \Delta A \div 5$$

ε---NADH 摩尔消光系数, $6.22 \times 10^3 \text{ L} / \text{mol} / \text{cm}$;

d---96 孔板光径, 0.5cm;

V---加入提取液体积, 1 mL;

V1---加入样本体积, 0.02 mL;

V2---反应体系总体积, $2 \times 10^{-4} \text{ L}$;

T---反应时间, 15 min;

W---样本质量, g;

5---细胞数量, 百万;

Cpr---样本蛋白质浓度, mg/mL; 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。