

丙酮酸磷酸双激酶(PPDK)活性测定试剂盒说明书

(货号: G0611W 微板法 96 样)

一、产品简介:

丙酮酸磷酸双激酶(pyruvate orthophosphate dikinase, PPDK, EC 2.7.9.1)是C4途径和景天科植物的一个重要限速酶,催化CO₂的原初受体磷酸烯醇式丙酮酸(PEP)的形成,对植物光合作用具有重要调节作用。

丙酮酸磷酸双激酶(PPDK)逆向催化磷酸烯醇式丙酮酸、AMP和P_{pi}生成丙酮酸、ATP和Pi。偶联乳酸脱氢酶进一步催化丙酮酸和NADH生成乳酸和NAD⁺。因此通过检测340nm处NADH的下降速率,即可得出PPDK的酶活性大小。

二、测试盒组成和配制:

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×1 支	-20°C保存	用前甩几下或离心使粉剂落入底部,再分别加 1.1mL 蒸馏水溶解备用。
试剂二	粉剂 mg×1 支	-20°C保存	
试剂三	粉剂 mg×3 支	-20°C保存	用前甩几下或离心使粉剂落入底部,每支分别加 0.44mL 蒸馏水溶解备用。用不完的试剂分装后-20°C保存,禁止反复冻融,三天内用完。
试剂四	粉剂 mg×1 支	4°C保存	用前甩几下或离心使粉剂落入底部,再加 2.2mL 蒸馏水溶解(可超声加速溶解),备用。
试剂五	液体 15mL×1 瓶	4°C保存	
试剂六	粉剂 mg×1 支	4°C保存	用前甩几下或离心使粉剂落入底部,再分别加 1.1mL 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、水浴锅、可调式移液器、研钵、冰。

四、丙酮酸磷酸双激酶(PPDK)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:

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

【注】:若增加样本量,可按照组织质量(g):提取液体积(mL)为1:5~10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)。
- ③ 在96孔板中依次加入:

试剂名称(μL)	测定管
样本	10
试剂一	10
试剂二	10
试剂三	10

试剂四	20
试剂五	130
试剂六	10
混匀，室温（25℃）条件下，立即于 340nm 处读取 A1，5min 后读取 A2， $\Delta A=A1-A2$ 。	

五、结果计算：

1、按样本蛋白浓度计算：

单位定义：每毫克组织蛋白在每分钟内氧化 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{PPDK 活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) &= [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T \\ &= 1286.2 \times \Delta A \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

2、按样本鲜重计算：

单位定义：每克组织在每分钟内氧化 1nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{PPDK 活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T \\ &= 1286.2 \times \Delta A \div W \end{aligned}$$

V---加入提取液体积，1 mL；

V1---加入样本体积，0.01mL；

V2---反应体系总体积， 2×10^{-4} L；

d---96 孔板光径，0.5cm；

ϵ ---NADH 摩尔消光系数， 6.22×10^3 L / mol / cm；

W---样本质量，g；

T---反应时间，5min；

Cpr---蛋白浓度（mg/mL），建议使用本公司的 BCA 蛋白含量测定试剂盒。