

磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 (PEPC) 活性检测试剂盒 (微量法)

产品货号: BA1211

产品规格: 100管/96样

产品简介:

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。

产品内容:

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体100mL×1瓶	2-8℃
试剂一	液体15mL×1瓶	2-8℃
试剂二	液体2mL×1瓶	2-8℃
试剂三	液体2mL×1瓶	2-8℃
试剂四	粉剂×1瓶	-20℃
试剂五	粉剂×1瓶	-20℃
试剂六原液	液体10 μ L×1瓶	2-8℃
试剂六稀释液	液体5mL×1瓶	2-8℃
试剂七	粉剂×1瓶	-20℃

溶液的配制:

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

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。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司
Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话: 400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

操作步骤:

一、粗酶液提取:

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 $\Delta A_{\text{测定管}} = A1_{\text{测定}} - A2_{\text{测定}}$, $\Delta A_{\text{空白管}} = A1_{\text{空白}} - A2_{\text{空白}}$, $\Delta A = \Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}$ 。空白管只需做一次。

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。

$$\begin{aligned} \text{PEPC 酶活 (U/mg prot)} &= \Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_{\text{反应总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \\ &= 321 \times \Delta A \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

(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。

$$\begin{aligned} \text{PEPC 酶活 (U/g 鲜重)} &= \Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_{\text{反应总}} \div (V_{\text{样}} \times W \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 321 \times \Delta A \div W \end{aligned}$$

(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。

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

ϵ : NADH 摩尔消光系数, 6.22×10³L/mol/cm; d : 比色皿光径, 1cm; $V_{\text{反应总}}$: 反应体系总体积, 2×10⁴L; $V_{\text{样}}$: 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; $V_{\text{样总}}$: 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 $d=1\text{cm}$ 改为 $d=0.6\text{cm}$ (比色皿光径) 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。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司
 Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 上海市徐汇区龙华路 2518 弄 14 号

电话: 400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com