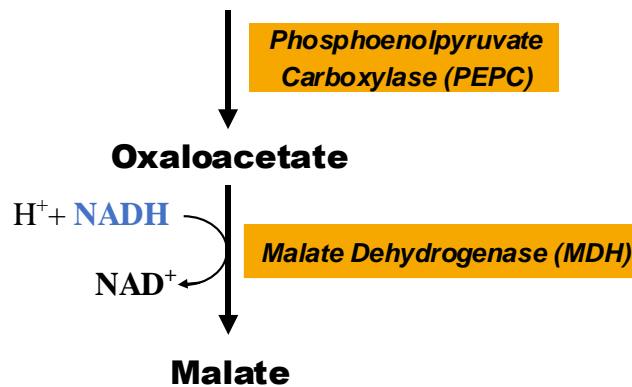




磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 (PEPC) 活性检测试剂盒
Phosphoenolpyruvate Carboxylase (PEPC) Activity Assay Kit

Phosphoenolpyruvate + CO₂



北京盒子生工科技有限公司
Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.



磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 (PEPC) 活性检测试剂盒

Phosphoenolpyruvate Carboxylase (PEPC) Activity Assay Kit

一、产品描述

磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶广泛存在于植物和微生物中，能够催化磷酸烯醇式丙酮酸与 CO_2 反应生成草酰乙酸，同时也是 C_4 植物和 CAM 植物固定 CO_2 的关键酶，在三羧酸循环运转过程中具有重要的调节作用。

磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶能够催化磷酸烯醇式丙酮酸和 CO_2 生成草酰乙酸和 HPO_4^{2-} ，苹果酸脱氢酶进一步催化草酰乙酸和 NADH 生成苹果酸和 NAD^+ ，NADH 在 340 nm 处具有特征吸收峰，通过吸光值的变化速率即可表征磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶的活性。

二、产品内容

名称	试剂规格	储存条件	使用说明及注意事项
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	使用前加入 2 mL 蒸馏水充分溶解 (分装后-20°C保存, 避免反复冻融)
试剂五	粉剂×1 瓶	-20°C保存	使用前加入 2 mL 蒸馏水充分溶解 (分装后-20°C保存, 避免反复冻融)
试剂六	组分 A	液体 10 μL ×1 支	按照组分 A:组分 B=4:821 的体积比配制 (根据使用量现用现配)
	组分 B	液体 5 mL×1 瓶	
试剂七	粉剂×1 瓶	-20°C保存	使用前加入 5 mL 蒸馏水充分溶解 (分装后-20°C保存, 避免反复冻融)
PEPC 工作液的配制 (现用现配): 根据样本量按试剂二: 试剂三: 试剂四: 试剂五: 试剂六: 试剂七=15:15:15:15:19:19 的体积比配制, 充分混匀即为 PEPC 工作液。			

注: 试剂六 组分 A 为微量试剂, 建议低转速适当离心收集液体, 并吹吸混匀后使用。

三、产品使用说明

测定过程中所需要的仪器和试剂：紫外分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿（光径 10 mm）/96 孔 UV 板、研钵/匀浆器、可调式移液器/多道移液器、台式离心机、恒温水浴/培养箱和蒸馏水。

1.粗酶液的制备（可根据预实验结果适当调整样本量及比例）

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 0.1 g 组织，加入 1 mL 提取液）处理样品，冰浴匀浆，4℃ 8000 g 离心 20 min，取上清置于冰上待测。

②细菌或细胞：离心收集细菌或细胞至离心管内，按照细菌或细胞数量（ 10^4 个）：提取液体积（mL）为（500-1000）：1 的比例（建议 500 万细菌或细胞加入 1 mL 提取液）处理样品，冰浴超声破碎（功率 300 W，超声 3 s，间隔 7 s，总时间 3 min），4℃ 8000 g 离心 20 min，取上清置于冰上待测。

2.测定步骤

①紫外分光光度计或酶标仪预热 30 min 以上，调节波长至 340 nm，蒸馏水调零。

②在 96 孔 UV 板或微量石英比色皿中依次加入下列试剂：

试剂	测定组 (μL)	空白组 (μL)
试剂一	90	90
PEPC 工作液	90	90
粗酶液	20	-
蒸馏水	-	20

吸光值测定：①充分混匀并立即开始计时，测定 10 s（总时间）时 340 nm 处吸光值，记为 A1 测定和 A1 空白；②30℃准确反应 300 s，测定 310 s（总时间）时 340 nm 处吸光值，记为 A2 测定和 A2 空白；③计算 ΔA 测定=A1 测定-A2 测定， ΔA 空白=A1 空白-A2 空白。注：空白组只需测定 1-2 次。

3.磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶（PEPC）活性计算

3.1 使用 96 孔 UV 板测定的计算公式

①按组织蛋白浓度计算

单位定义：每 mg 组织蛋白每分钟消耗 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{PEPC (U/mg prot)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times 10^9}{\epsilon \times d_1 \times \text{Cpr} \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{643.09 \times \Delta A}{\text{Cpr}}$$

②按组织样本质量计算

单位定义：每 g 组织每分钟消耗 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{PEPC (U/g)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{样总}} \times 10^9}{\epsilon \times d_1 \times W \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{643.09 \times \Delta A}{W}$$

③按细菌或细胞数量计算

单位定义：每 10^4 个细菌或细胞每分钟消耗 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{PEPC (U/10}^4 \text{ cell)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{样总}} \times 10^9}{\varepsilon \times d_1 \times \text{细菌或细胞数量} \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{643.09 \times \Delta A}{\text{细菌或细胞数量}}$$

3.2 使用微量石英比色皿测定的计算公式

①按组织蛋白浓度计算

单位定义：每 mg 组织蛋白每分钟消耗 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{PEPC (U/mg prot)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times 10^9}{\varepsilon \times d_2 \times \text{Cpr} \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{321.54 \times \Delta A}{\text{Cpr}}$$

②按组织样本质量计算

单位定义：每 g 组织每分钟消耗 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{PEPC (U/g)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{样总}} \times 10^9}{\varepsilon \times d_2 \times W \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{321.54 \times \Delta A}{W}$$

③按细菌或细胞数量计算

单位定义：每 10^4 个细菌或细胞每分钟消耗 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{PEPC (U/10}^4 \text{ cell)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{样总}} \times 10^9}{\varepsilon \times d_2 \times \text{细菌或细胞数量} \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{321.54 \times \Delta A}{\text{细菌或细胞数量}}$$

注释： V 样：反应体系中加入粗酶液的体积，0.02 mL；V 样总：粗酶液总体积，1 mL；V 反总：反应体系总体积， 2×10^{-4} L； ε ：NADH 摩尔消光系数， 6.22×10^3 L/mol/cm； d_1 ：96 孔 UV 板光径，0.5 cm； d_2 ：微量石英比色皿光径，1 cm；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；W：样本质量，g；细菌或细胞数量，以万计；T：反应时间，5 min。

四、注意事项

①准确在 10 s 和 310 s 处完成吸光值测定，以确保实验结果的准确性和重复性；若使用 96 孔 UV 板测定需使用多道移液器且分批进行测定，以确保组间反应时间一致；

②空白组为检测各试剂组分质量的检测孔，正常情况下 ΔA 空白应小于 0.01；

③若 ΔA 测定大于 0.6，建议将粗酶液使用提取液适当稀释后再进行测定；若 ΔA 测定小于 0.02，建议增加样本量重新制备粗酶液后再进行测定，计算时相应修改；

④为保证结果准确且避免试剂损失，测定前请仔细阅读说明书（以实际收到说明书内容为准），确认试剂储存和准备是否充分，操作步骤是否清楚，且务必取 2-3 个预期差异较大的样本进行预测定，过程中问题请您及时与工作人员联系。

For Research Use Only. Not for Use in Diagnostic Procedures.

