

## 磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 (PEPC) 活性检测试剂盒说明书

产品货号	产品名称	包装规格	测定方法
PMHC1-M48	磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 (PEPC) 活性检测试剂盒	48T	微量法
PMHC1-M96		96T	

### 一、测定意义：

磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 (PEPC) 广泛存在于光合生物，还存在于很多非光合细菌和原生动物中，催化磷酸烯醇式丙酮酸与二氧化碳反应生成草酰乙酸和无机磷酸的不可逆反应。PEPC 在植物细胞中参与植物的光合碳同化等重要代谢途径，并且在不同组织中具有多种生理作用。同时也参与调控植物种子的营养物质合成和代谢过程，控制糖类物质流向脂肪酸合成或者蛋白质合成途径。

### 二、测定原理：

PEPC 催化磷酸烯醇式丙酮酸和  $\text{HCO}^3-$ 生成草酰乙酸，草酰乙酸在苹果酸脱氢酶催化下,可被 NADH 还原成苹果酸，通过在 340nm 测定反应体系吸光度的减少，可计算 PEPC 的活性。

### 三、试剂组成：

试剂名称	试剂装量(48T)	试剂装量(96T)	保存条件
提取液	液体 60mL×1 瓶	液体 110mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 10mL×1 瓶	液体 20mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	液体 1mL×1 支	液体 1mL×2 支	2-8℃保存
试剂三	粉剂×1 支	粉剂×1 支	-20℃保存
<b>试剂三的配制：</b> 用时每瓶粉剂加入蒸馏水 1mL，混匀充分溶解，现用现配。			
试剂四	粉剂×1 支	粉剂×1 支	-20℃保存
<b>试剂四的配制：</b> 用时每瓶粉剂加入蒸馏水 1mL，混匀充分溶解，现用现配。			
试剂五	粉剂×1 支	粉剂×1 支	-20℃保存
<b>试剂五的配制：</b> 用时每瓶粉剂加入蒸馏水 1mL，混匀充分溶解，现用现配。			
试剂六	粉剂×1 支	粉剂×1 支	-20℃保存
<b>试剂六的配制：</b> 用时每瓶粉剂加入蒸馏水 1mL，混匀充分溶解，现用现配。			

**工作液的配制：**临用前每个样本将试剂一、试剂二、试剂三、试剂四、试剂五、试剂六按照 13: 1: 1: 1: 1: 1 的比例混匀,恢复室温。

### 四、操作步骤：

#### 样本前处理

取一定量植物组织擦净水分及杂质，剪碎后放入研钵，加入液氮，研磨成粉状后转移出来，然后准确称重，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)，旋涡混匀抽提 3-5 分钟或者使用组织破碎仪冰浴提取，8000g，4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

#### 测定步骤

1. 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 340nm，蒸馏水调零。

2. 操作表 (在 96 孔 UV 板中加入下列试剂) :

试剂名称	测定管	空白管
样品 ( $\mu\text{L}$ )	20	-
双蒸水 ( $\mu\text{L}$ )	-	20
工作液 ( $\mu\text{L}$ )	180	180

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  $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$ ，  
 $\Delta A_{\text{空白}} = A_{\text{空白}} - A_{\text{空白}}$ ， $\Delta A = \Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}$ 。 (空白管只需做 1-2 次)。

### 五、磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 (PEPC) 活性计算：

1、按样本鲜重计算：

**单位定义：**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。

**计算公式：**  $\text{PEPC (nmol/g/min)} = \Delta A \div (\varepsilon \times d) \times 10^9 \times V_{\text{反应}} \div (V_{\text{样本}} \times W \div V_{\text{总}}) \div T = 535.91 \times \Delta A \div W$

2、按样本蛋白浓度计算：

**单位定义：**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。

**计算公式：**PEPC (nmol/min/mg prot) =  $\Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 535.91 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$

$V_{\text{反总}}$ : 反应体系总体积,  $2.0 \times 10^{-4}$  L;  $\epsilon$ : NADH 摩尔消光系数,  $6.22 \times 10^3$  L/mol/cm;  $d$ : 96 孔 UV 板光径, 0.6cm;  $V_{\text{样}}$ : 加入样本体积, 0.02mL;  $V_{\text{样总}}$ : 加入提取液体积, 1mL;  $T$ : 反应时间, 5min;  $C_{\text{pr}}$ : 样本蛋白质浓度, mg/mL;  $10^9$ : 单位换算系数, 1mol=10<sup>9</sup>nmol;  $W$ : 样本质量, g。

## 六、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,  $\Delta A$  大于 0.3 时, 建议将粗酶液用提取液稀释后再进行测定。当 $\Delta A$  小于 0.01 时, 可以延长反应时间 (10min 或 15min) 来测定。

2、在波长 340nm 处测定吸光度的变化, 需使用 96 孔 UV 板。

## 【厂家信息】

生产企业：南京陌凡生物科技有限公司

地址：南京市栖霞区红枫科技园 A6 栋 2 层

## 【售后微信】



## 【说明书核准及修改日期】

核准日期：2025 年 4 月 7 日

修改日期：2025 年 4 月 7 日