



丙酮酸磷酸双激酶活性检测试剂盒

PPDK Assay Kit

微量法

产品编号: AK513M

产品规格: 100T/96S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
ES513	100mL×1 瓶	4℃保存;
AK513-A	25 mL×1 瓶	4℃保存;
AK513-B	粉剂×2 瓶	-20℃保存;
AK513-C	40μL×1 支	4℃保存; 体积较少, 若沾在管壁上, 临用前可低速离心后使用。

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介:

意义: 丙酮酸磷酸双激酶 (pyruvate phosphate dikinase, PPDK, EC 2.7.9.1) 是 C4 途径和景天科酸代谢途径的限速酶, 催化 ATP、丙酮酸和 Pi 经三步反应生成磷酸烯醇式丙酮酸。该酶主要存在于 C4 植物的叶绿体基质中, 对光合功能具有重要调节作用。

原理: PPDK 的逆向反应催化磷酸烯醇式丙酮酸、AMP 和 P_i 生成丙酮酸、ATP 和 P_i, 乳酸脱氢酶进一步催化丙酮酸和 NADH 生成乳酸和 NAD⁺, 在 340nm 测定 NADH 减少速率, 计算 PPDK 活性。

自备用品:

紫外分光光度计/酶标仪、台式离心机、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔板、研钵、冰和蒸馏水。

酶液提取:

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 ES513), 进行冰浴匀浆。12000g, 4℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

测定步骤:

- 分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 340nm, 蒸馏水调零。
- 工作液的配制: 临用前取 AK513-B 一瓶加入 10mL AK513-A 和 5μL AK513-C, 充分混匀, 置于 37℃水浴 5min; 用不完的试剂分装后-20℃保存, 禁止反复冻融。
- 在 1mL 石英比色皿中加入下列试剂:

试剂名称	测定管 (ul)
样本	10
工作液	190
混匀, 立即记录 340nm 处初始吸光值 A1 和 37℃反应 5min 后的吸光值 A2, 计算 ΔA=A1-A2。	

PPDK 活性计算:

a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

- 按样本蛋白浓度计算

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

$$PPDK (\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 643 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

- 按样本鲜重计算

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。

$$PPDK (\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 643 \times \Delta A \div W$$

注：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：比色皿光径，1cm；V 样：加入样本体积，0.01 mL；V 样总：加入提取液体积，1 mL；T：反应时间，5 min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；500：细菌或细胞总数，500 万。

b. 用 96 孔板测定的计算公式如下

1. 按样本蛋白浓度计算

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

$$\text{PPDK (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V \text{ 样} \times \text{Cpr}) \div T = 1286 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

2. 按样本鲜重计算

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。

$$\text{PPDK (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 1286 \times \Delta A \div W$$

注：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：96 孔板光径，0.5cm；V 样：加入样本体积，0.01 mL；V 样总：加入提取液体积，1 mL；T：反应时间，5 min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g。