

PEPC 检测方法

S10210

1 原理



NADH 的消耗可以通过 340nm 的光吸收进行检测。

2 试剂:

A: 0.1M Tris-HCl 缓冲液, pH8.0: 将 pH 8.0 的 1M Tris-HCl 缓冲液稀释 10 倍, 校正 pH8.0

B 0.1M Na₂CO₃ 溶液: 称取 1.06g Na₂CO₃ 溶于 100ml 水中。

C 32mM PEP-K 溶液: 称取 33mg PEP-K (MW 206.1), 溶于 5ml 的水中。

D 1M MgSO₄ 溶液: 称取 4.93g MgSO₄·7H₂O (MW 246.48) 溶于 20ml 水中。

E 1.4mM NADH 溶液: 称取 10mg NADH (MW 709) 溶于 10ml 水中

F 300U/ml MDH 溶液: 称取适量的 MDH (苹果酸脱氢酶) 溶于水中。

G 20mM K-P 酶稀释液: 将 1M K-P 缓冲液稀释 50 倍, 调整 pH 为 7.0。

3 操作规程:

3.1 仪器参数设定

若仪器中无已保存参数, 按以下参数设定。若已有相关参数, 调取后确认。

检测方法: 动力学扫描

测量波长: 340nm 反应时间: 240S

延迟时间: 180S 积分时间: 60S

系数/因子: 4.98 测量温度: 30±0.5°C

3.2 样品准备

若待测样品为固体, 可以按 10mg 样品/1000ul 超纯水比例溶解。溶解后于 2-8 度放置 30min。

3.3 检测方法

3.3.1 在比色皿加入 1.77ml 0.1M Tris-HCl 缓冲液, pH 8.0 (A)

0.30ml 0.1M Na₂CO₃ 溶液 (B)

0.30ml 32mM PEP-K 溶液 (C)

0.03ml 1M MgSO₄ 溶液 (D)

0.30ml 1.4mM NADH 溶液 (E)

0.30ml 300U/ml MDH 溶液 (F)

于 30 度平衡 2min

3.3.2 加入 100ul 样品, 温和混匀后开始测定。

3.3.3 测定结束后, 记录相应数值: 起始读数、 $\Delta A/\text{min}$ 、活性值 (U/ml)。

3.3.4 活性值 (U/ml) 范围为 0.2-0.7U/ml, 若超出范围, 待测样品需经酶稀释液 G 稀释后再次进行检测。

3.3.5 计算公式 活性(U/ml) = $\Delta A_{340\text{nm}} \times 4.98 \times \text{df}$ (稀释倍数)