



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

丙酮酸磷酸双激酶活性检测试剂盒(微量法)

货号: R42135

规格: 100T/96S

保质期: 6个月

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
ES513	100mL×1瓶	4℃保存;
试剂-A	25 mL×1瓶	4℃保存;
试剂-B	粉剂×2瓶	-20℃保存;
试剂-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, PPK, 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: PPK 的逆向反应催化磷酸烯醇式丙酮酸、AMP 和 PPi 生成丙酮酸、ATP 和 Pi, 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 PPK 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 (UV 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:

1. 分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 340nm, 蒸馏水调零。
2. 工作液的配制: 临用前取 试剂-B 一瓶加入 10mL 试剂-A 和 5 μL 试剂-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。
3. 在微量石英比色皿或 96 孔板 (UV 板) 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 $\Delta A = A1 - A2$ 。

PPDK 活性计算:

- a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

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。

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

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。

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

注: $V_{\text{反总}}$: 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; $V_{\text{样}}$: 加入样本体积, 0.01 mL; $V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积, 1 mL; T : 反应时间, 5 min; C_{pr} : 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。

$$\text{PPDK (U/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 1286 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

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。



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

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

注: $V_{\text{反总}}$: 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; $V_{\text{样}}$: 加入样本体积, 0.01 mL; $V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积, 1 mL; T : 反应时间, 5 min; C_{pr} : 样本蛋白质浓度, mg/mL; W : 样本质量, g。



源叶