

## 磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 (PEPC)试剂盒说明书

(货号: BP10449W 微板法 96 样 有效期: 3 个月)

### 一、指标介绍:

磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 (PEPC, EC 4.1.1.31) 是 C<sub>4</sub> 植物和 CAM 植物光合碳代谢的关键酶, 起着固定环境中 CO<sub>2</sub> 的作用。催化 PEP 和 CO<sub>2</sub> 羧化形成草酰乙酸的不可逆反应, 此酶在光合碳同化、呼吸作用和物质代谢等方面均有重要作用。

PEPC 催化磷酸烯醇式丙酮酸 (PEP) 和 CO<sub>2</sub> 生成草酰乙酸, 苹果酸脱氢酶进一步催化草酰乙酸和 NADH 生成苹果酸和 NAD<sup>+</sup>, 通过测定 NADH 在 340nm 下的减少速率, 即可计算出 PEPC 酶活性大小。

### 二、试剂盒的组成和配制:

| 试剂组分 | 试剂规格         | 存放温度    | 注意事项                                                                                              |
|------|--------------|---------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 提取液  | 液体 100mL×1 瓶 | 4℃ 保存   |                                                                                                   |
| 试剂一  | 粉剂 2 支       | -20℃ 保存 | 每支:<br>1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底;<br>2. 加入 1.1mL 蒸馏水溶解备用, 用不完的试剂分装后-20℃保存, 禁止反复冻融, 三天内用完。 |
| 试剂二  | 液体 15mL×1 瓶  | 4℃ 保存   |                                                                                                   |
| 试剂三  | 粉剂 1 瓶       | -20℃ 保存 | 1. 开盖前注意使粉体落入底部(可手动甩一甩);<br>2. 加入 3.2mL 蒸馏水溶解备用;<br>3. 保存周期与试剂盒有效期相同。                             |

### 三、实验器材:

研钵 (匀浆机)、冰盒 (制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅 (烘箱、培养箱、金属浴)、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

### 四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本 (例如不同类型或分组) 进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

#### 1、样本提取:

##### ① 组织样本:

称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆。12000rpm, 4℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 也可以按照组织质量 (g): 提取液体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例提取)

#### 2、检测步骤:

- ① 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 340nm。
- ② 所有试剂解冻至室温 (25℃), 试剂二和三可按测定样本数量提前混合 (混合比例依据依据加样表) (现配现用)。
- ③ 在 96 孔板中依次加入:

| 试剂组分 (μL) | 测定管 |
|-----------|-----|
| 样本        | 20  |
| 试剂一       | 20  |

|                                                                                        |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 试剂二                                                                                    | 140 |
| 试剂三                                                                                    | 20  |
| 轻轻混匀，室温 (25℃) 条件下，于 340nm 处读取吸光值 A，1min 后读取吸光值 A1，15min 后读取 A2， $\Delta A = A1 - A2$ 。 |     |

- 【注】1. 若  $\Delta A$  的值在零附近，可以适当延长反应时间到 25min 后读取 A2，改变后的反应时间需代入计算公式重新计算。或加大样本量（如增加到 30-50 $\mu$ L），则改变后的加样体积需代入计算公式重新计算。
2. 若起始值 A1 太大如超过 2（如颜色较深的植物叶片，一般色素较高，则起始值相对会偏高），可以适当减少样本加样量，则改变后的加样体积需代入计算公式重新计算。  
或向待测样本中加少许活性炭混匀静置 5min 后 12000rpm, 4℃离心 10min，上清液用于检测；
3. 若  $\Delta A$  的值大于 0.4，则需减少反应时间（如减少至 5min），则改变后的反应时间 T 需代入计算公式重新计算。
4. 若下降趋势不稳定，可以每隔 10S 读取一次吸光值，选取一段线性下降的时间段来参与计算，相对应的 A 值也代入计算公式重新计算。

## 五、结果计算：

### 1、按样本蛋白浓度计算：

酶活定义：每毫克组织蛋白每分钟消耗 1nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{PEPC}(\text{nmol/min/mg prot}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V2] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T = 214.4 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

### 2、按样本鲜重计算：

酶活定义：每克组织每分钟消耗 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{PEPC}(\text{nmol/min/g 鲜重}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V2] \div (W \times V1 \div V) \div T = 214.4 \times \Delta A \div W$$

$\epsilon$ ---NADH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3 \text{ L / mol / cm}$ ；

d---96 孔板光径，0.5cm；

V---加入提取液体积，1 mL；

V1---加入样本体积，0.02 mL；

V2---反应体系总体积， $2 \times 10^{-4} \text{ L}$ ；

T---反应时间，15 min；

W---样本质量，g；

Cpr---样本蛋白质浓度，mg/mL；建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。