

## 丙酮酸磷酸双激酶（PPDK）活性检测试剂盒（微量法）

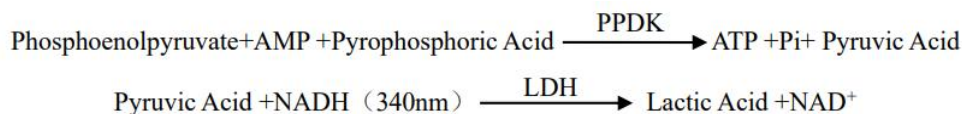
产品货号：BA2098

产品规格：100T/96S

### 产品简介：

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。

PPDK的逆向反应催化磷酸烯醇式丙酮酸（PEP）、AMP和PPi生成丙酮酸、ATP和Pi，乳酸脱氢酶（LDH）进一步催化丙酮酸和NADH生成乳酸和NAD<sup>+</sup>，在340nm测定NADH减少速率，据此可以计算PPDK活性。



**注意：**实验之前建议选择2-3个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

### 产品组成：

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体110mL×1瓶	2-8℃
试剂一	液体15mL×1瓶	2-8℃
试剂二	粉剂×1支	-20℃
试剂三	液体1.1mL×1瓶	2-8℃
试剂四	粉剂×1支	2-8℃
试剂五	粉剂×1支	-20℃
试剂六	液体45μL×1支	2-8℃

### 溶液的配制：

1. 试剂二：临用前加入1.1mL蒸馏水充分溶解，未用完的试剂-20℃分装保存4周，避免反复冻融。
2. 试剂四：临用前加入1.1mL蒸馏水充分溶解，未用完的试剂-20℃分装保存4周，避免反复冻融。
3. 试剂五：临用前加入1.25mL蒸馏水充分溶解，未用完的试剂-20℃分装保存4周，避免反复冻融。
4. 试剂六工作液：临用根据样本量按照试剂六：蒸馏水=10μL：240μL（共250μL，25T）的比例配制成，现配现用。
5. 工作液的配制：临用前按样本量将试剂二：试剂三：试剂四：试剂五：试剂六工作液=0.25mL：0.25mL：0.25mL：0.25mL：0.25mL（共1.25mL，约25T）配制成工作液使用，现配现用。

### 需自备的仪器和用品：

紫外分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96孔UV板、天平、低温离心机、水浴锅、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水。

### 操作步骤：

#### 一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

1. 组织：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）进行冰浴匀浆。12000g，4℃离心10min，取上清置于冰上待测。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司  
Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q：807961520

邮箱：saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

## 二、测定步骤

1. 紫外分光光度计/酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 340nm。分光光度计用蒸馏水调零。
2. 试剂一 37°C 预热 10min。
3. 操作表（在微量石英比色皿/96 孔 UV 板依次加入）

试剂名称 (μL)	空白管	测定管
试剂一	130	130
工作液	50	50
样本	-	20
提取液	20	-

在微量石英比色皿/96 孔 UV 板中分别加入上述试剂，充分混匀后记录 340nm 下 10s 时的初始吸光度 A1 空白、A 测定，之后迅速将微量石英比色皿连同反应液一起置于 37°C 水浴中准确反应 5min，迅速取出，340nm 下记录 5min10s 时的吸光度 A2 空白、A2 测定，计算  $\Delta A$  测定=A1 测定-A2 测定， $\Delta A$  空白=A1 空白-A2 空白， $\Delta A = \Delta A$  测定- $\Delta A$  空白。空白管只需做 1-2 次。

## 三、丙酮酸磷酸双激酶（PPDK）计算公式

### 1. 使用 96 孔 UV 板测定：

#### (1) 按样本蛋白浓度计算：

酶活定义：每 mg 组织蛋白在反应体系中每分钟减少 1nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{PPDK 活性 (U/mg prot)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V \text{反} \times 10^9 \div (\text{Cpr} \times V \text{样}) \div T \times F = 535.91 \times \Delta A \div \text{Cpr} \times F$$

#### (2) 按样本蛋白质量计算：

酶活定义：每 g 组织在反应体系中每分钟减少 1nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{PPDK 活性 (U/g 质量)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V \text{反} \times 10^9 \div (W \div V \text{提取} \times V \text{样}) \div T \times F = 535.91 \times \Delta A \div W \times F$$

$\epsilon$ : NADH 摩尔消光系数,  $6.22 \times 10^3 \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{cm})$ ;  $d$ : 比色皿光径, 0.6cm;  $V$  反: 反应体系体积,  $2 \times 10^{-4} \text{ L}$ ;  $V$  样: 反应体系中加入的样本体积, 0.02mL;  $V$  提取: 加入提取液的体积, 1mL;  $T$ : 反应时间, 5min;  $\text{Cpr}$ : 样本蛋白浓度, mg/mL;  $W$ : 样本质量, g;  $F$ : 稀释倍数;  $10^9$ : 单位换算,  $1 \text{ mol} = 10^9 \text{ nmol}$ 。

### 2. 使用微量石英比色皿测定：

将上述公式中的  $d=0.6\text{cm}$  改为  $d=1\text{cm}$ （微量石英比色皿光径）进行计算即可。

## 注意事项：

1. 测定过程中样本和工作液在冰上放置，以免变性和失活。
2. 最好两个人同时做此实验，一个人比色，一个人计时，以保证实验结果的准确性。
3. 当样本  $\Delta A < 0.005$  时，可适当延长酶促反应时间或增大样本量后测定；当样本  $\Delta A > 0.6$  时，可用蒸馏水稀释上清液后测定，注意同步修改计算公式中的稀释倍数。



扫一扫 加微信

**上海尚宝生物科技有限公司**  
 Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址: 上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话: 400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com