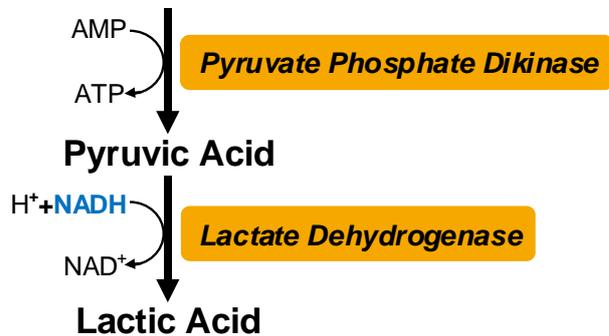




丙酮酸磷酸双激酶 (PPDK) 活性检测试剂盒
Pyruvate Phosphate Dikinase (PPDK) Activity Assay Kit

Phosphoenolpyruvate (PEP)



北京盒子生工科技有限公司
Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.



丙酮酸磷酸双激酶 (PPDK) 活性检测试剂盒

Pyruvate Phosphate Dikinase (PPDK) Activity Assay Kit

一、产品描述

丙酮酸磷酸双激酶是 C4 途径和 CAM (Crassulacean Acid Metabolism) 途径的限速酶, 能够催化丙酮酸和磷酸化合物之间的转化反应, 在丙酮酸代谢、能量代谢和植物光合作用等过程中发挥着重要作用, 其活性分析对光合作用、碳代谢调控和抗逆应答等研究具有重要意义。

丙酮酸磷酸双激酶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⁺, NADH 在 340 nm 处具有特征吸收峰, 通过吸光值反应速率即可表征丙酮酸磷酸双激酶的活性。

二、产品内容

名称	试剂规格	储存条件	使用说明及注意事项
提取液	液体 110 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂一	液体 15 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂二	粉剂×1 支	-20°C 保存	使用前加入 1.1 mL 蒸馏水充分溶解 (分装后-20°C可保存一个月, 避免反复冻融)
试剂三	液体 1.1 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂四	粉剂×1 支	4°C 保存	使用前加入 1.1 mL 蒸馏水充分溶解 (分装后-20°C可保存一个月, 避免反复冻融)
试剂五	粉剂×1 支	-20°C 保存	使用前加入 1.25 mL 蒸馏水充分溶解 (分装后-20°C可保存一个月, 避免反复冻融)
试剂六	液体 45 μL×1 支	4°C 保存	使用前按试剂六:蒸馏水=1:24 体积比配制 (现用现配, 充分混匀即为试剂六应用液)

三、产品使用说明

测定过程中所需要的仪器和试剂: 紫外分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿 (光径 10 mm) /96 孔 UV 板、研钵/匀浆器、可调式移液器、台式离心机、恒温水浴/培养箱和蒸馏水。

1.粗酶液的制备（可根据预实验结果适当调整样本量及比例）

按照组织质量（g）：提取液体积（mL）为 1:（5-10）的比例（建议称取 0.1 g 组织，加入 1 mL 提取液）处理样品，冰浴匀浆，4°C 12000 g 离心 10 min，取上清置于冰上待测。

2.测定步骤

①紫外分光光度计或酶标仪预热 30 min 以上，调节波长至 340 nm，蒸馏水调零。

②试验前将试剂一 37°C 预热 10 min 以上。

③检测工作液的制备（现用现配）：根据使用量按试剂二：试剂三：试剂四：试剂五：试剂六应用液=1:1:1:1:1 的体积比配制，充分混匀即为检测工作液。

④在 96 孔 UV 板或微量石英比色皿中依次加入下列试剂：

试剂	测定组 (μL)	空白组 (μL)
试剂一	130	130
检测工作液	50	50
粗酶液	20	-
提取液	-	20

吸光值测定：①充分混匀并立即开始计时，测定 10 s（总时间）时 340 nm 处吸光值，记为 A1 测定和 A1 空白；②37°C 准确反应 300 s，测定 310 s（总时间）时 340 nm 处吸光值，记为 A2 测定和 A2 空白；③计算 ΔA 测定=A1 测定-A2 测定， ΔA 空白=A1 空白-A2 空白， $\Delta A = \Delta A$ 测定- ΔA 空白。注：空白组只需测定 1-2 次。

3.丙酮酸磷酸双激酶（PPDK）活性计算

3.1 使用 96 孔 UV 板测定的计算公式

①按组织蛋白浓度计算

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

$$\text{PPDK (U/mg prot)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times 10^9}{\epsilon \times d_1 \times V_{\text{样}} \times \text{Cpr} \times T} = \frac{643.09 \times \Delta A}{\text{Cpr}}$$

②按组织样本质量计算

单位定义：每 g 组织样本每分钟消耗 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{PPDK (U/g)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{样总}} \times 10^9}{\epsilon \times d_1 \times V_{\text{样}} \times W \times T} = \frac{643.09 \times \Delta A}{W}$$

3.2 使用微量石英比色皿测定的计算公式

①按组织蛋白浓度计算

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

$$\text{PPDK (U/mg prot)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times 10^9}{\epsilon \times d_2 \times V_{\text{样}} \times \text{Cpr} \times T} = \frac{321.54 \times \Delta A}{\text{Cpr}}$$

②按组织样本质量计算

单位定义：每 g 组织样本每分钟消耗 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{PPDK (U/g)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{样总}} \times 10^9}{\epsilon \times d_2 \times V_{\text{样}} \times W \times T} = \frac{321.54 \times \Delta A}{W}$$

注释： V 样：反应体系中加入粗酶液的体积，0.02 mL；V 样总：粗酶液总体积，1 mL；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_1 ：96 孔 UV 板光径，0.5 cm； d_2 ：微量石英比色皿光径，1.0 cm；T：反应时间，300 s=5 min；W：样本质量，g； 10^9 ：单位换算系数，1 mol/L= 10^9 nmol/L。

四、注意事项

- ①测定过程中粗酶液和检测工作液应置于冰上放置，以免变性和失活；
- ②准确在规定时间内完成吸光值测定，以确保检测结果的准确性和重复性；若使用酶标仪应使用多道移液器且分批进行检测，以确保组间反应时间一致；
- ③若 ΔA 大于 0.6，建议将粗酶液适当稀释后再进行测定；若 ΔA 小于 0.02，建议适当延长酶促反应时间或增加样本量后再进行测定，计算时相应修改；
- ④为保证结果准确且避免试剂损失，测定前请仔细阅读说明书（以实际收到说明书内容为准），确认试剂储存和准备是否充分，操作步骤是否清楚，且务必取 2-3 个预期差异较大的样本进行预测定，过程中问题请您及时与工作人员联系。

For Research Use Only. Not for Use in Diagnostic Procedures.

boxbio

Manufactured and Distributed by

Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.
Liandong U Valley, Tongzhou District, Beijing, China

TEL: 400-805-8228

E-MAIL: techsupport@boxbio.cn

Copyright © 2020 Boxbio, All Rights Reserved.

