

丙酮酸磷酸双激酶(PPDK)活性测定试剂盒说明书

(货号: ADS-W-FM033 微板法 96 样 有效期: 3 个月)

一、指标介绍:

丙酮酸磷酸双激酶(pyruvate orthophosphate dikinase, PPDK, EC 2.7.9.1)是C 4途径和景天科植物的一个重要限速酶, 催化CO₂的原初受体磷酸烯醇式丙酮酸(PEP)的形成, 对植物光合作用具有重要调节作用。

丙酮酸磷酸双激酶(PPDK)逆向催化磷酸烯醇式丙酮酸、AMP和 Ppi生成丙酮酸、ATP和Pi。偶联乳酸脱氢酶进一步催化丙酮酸和NADH生成乳酸和NAD⁺。因此通过检测340nm处NADH的下降速率, 即可得出PPDK的酶活性大小。

二、测试盒组成和配制:

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 1 支	-20℃ 保存	每支:
试剂二	粉剂 1 支	-20℃ 保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底; 2. 分别加 1.1mL 蒸馏水溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂三	粉剂 3 支	-20℃ 保存	每支: 1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底; 2. 加入 0.44mL 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。
试剂四	粉剂 1 瓶	4℃ 避光保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部(可手动甩一甩); 2. 加入 2.2mL 蒸馏水溶解(可超声加速溶解), 备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂五	液体 15mL×1 瓶	4℃ 避光保存	
试剂六	液体 1 支	4℃ 保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底; 2. 加入 1.1mL 蒸馏水溶解备用; 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:

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

【注】: 若增加样本量, 可按照组织质量(g): 提取液体积(mL)为 1: 5~10 的比例进行提取。

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℃）。
- ③ 在 96 孔板中依次加入：

试剂组分 (μL)	测定管
样本	10
试剂一	10
试剂二	10
试剂三	10
试剂四	20
试剂五	130
试剂六	10
混匀，室温（25℃）条件下，立即于 340nm 处读取 A1，5min 后读取 A2。△A=A1-A2。	

- 【注】 1.若△A 在零附近，可适当延长反应时间 T（如增至 10min 或更长读取 A2）。或适当加大样本量 V1（如增至 20μL，则试剂五相应减少），则改变后的 T 或 V1 需代入公式重新计算。
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），可减少样本加样量 V1（如减至 5μL，则试剂五相应增加），则改变后的 V1 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△A 的值大于 0.5，则需减少反应时间 T（如减少至 1min），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 20S 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：

单位定义：每毫克组织蛋白在每分钟内氧化 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

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

$$= 1286.2 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

2、按样本鲜重计算：

单位定义：每克组织在每分钟内氧化 1nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

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

$$= 1286.2 \times \Delta A \div W$$

V---加入提取液体积，1 mL；

V1---加入样本体积，0.01mL；

V2---反应体系总体积，2×10⁻⁴ L；

d---96 孔板光径，0.5cm；

ε---NADH 摩尔消光系数，6.22×10³ L / mol / cm；

W---样本质量，g；

T---反应时间，5min；

Cpr---蛋白浓度（mg/mL），建议使用本公司的 BCA 蛋白含量测定试剂盒。