磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶（PEPC)试剂盒说明书

（货号：G0606W 微板法 96 样）

一、产品简介：

磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶（PEPC，EC 4.1.1.31）是 C_4 植物和 CAM 植物光合碳代谢的关键酶，起着固定环境中 CO_2 的作用。催化 PEP 和 CO_2 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_2 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^+，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：

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 100mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉剂 mg×2 支	-20℃保存	用前甩几下或离心使试剂落入底部，再加 1.1mL 蒸馏水溶解，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 mg×1 支	-20℃保存	用前甩几下或离心使试剂落入底部，再加 2.1mL 蒸馏水溶解备用

三、所需的仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、台式离心机、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

四、磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶（PEPC)活性测定：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

1、样本制备：

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、上机检测：

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：

试剂名称（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，ΔA=A1-A2。

【注】1.若△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 30-50μL），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ΔA 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。

PEPC(nmol/min/mg prot)=[ΔA÷(ε×d)×10^9×V2]÷(V1×Cpr)÷T=214.4×ΔA÷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。

PEPC(nmol/min/g 鲜重)=[ΔA÷(ε×d)×10^9×V2]÷(W×V1÷V)÷T=214.4×ΔA÷W

ε---NADH 摩尔消光系数，6.22×10^3 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，2×10^{-4} 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。