

磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶（PEPC）活性检测试剂盒说明书

微量法

注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。

货号：BC2195

规格：100T/96S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 110 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 15 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	液体 2 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂三	液体 2 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂四	粉剂×1 瓶	-20℃保存
试剂五	粉剂×1 瓶	-20℃保存
试剂六	粉剂×1 支	-20℃保存
试剂六溶解液	液体 5 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂七	粉剂×1 瓶	-20℃保存

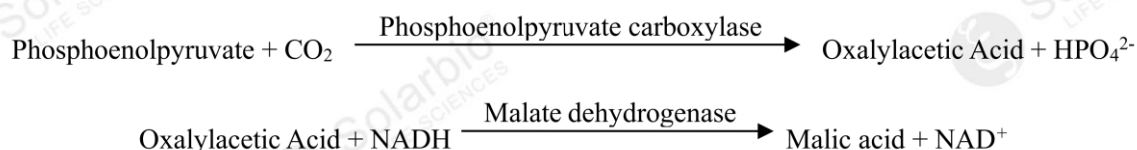
溶液的配制：

- 1、 试剂四：临用前加入 2 mL 蒸馏水充分溶解待用；可分装后-20℃保存 4 周，避免反复冻融；
- 2、 试剂五：临用前加入 2 mL 蒸馏水充分溶解待用；可分装后-20℃保存 4 周，避免反复冻融；
- 3、 试剂六：临用前加入 250μL 试剂六溶解液溶解；可分装后-20℃保存 4 周，避免反复冻融；
- 4、 试剂七：临用前加入 5.26 mL 蒸馏水，可分装后-20℃保存 4 周，避免反复冻融；
- 5、 工作液的配制：根据样本数量按体积比试剂二：试剂三：试剂四：试剂五：试剂六：试剂六溶解液：试剂七=270μL：270μL：270μL：270μL：35μL：325μL：360μL（共 1.8mL，20T）的比例混合。工作液现用现配。

产品说明：

磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶（EC 4.1.1.31）广泛存在于植物和微生物中，在动物及丝状霉菌中缺乏此酶。是催化磷酸烯醇式丙酮酸与二氧化碳反应生成草酰乙酸呈不可逆反应的酶，同时也是 C4 植物和 CAM 植物固定 CO₂ 的关键酶，对三羧酸循环的运转起重要调节作用。

PEPC 催化磷酸烯醇式丙酮酸和 CO₂ 生成草酰乙酸和 HPO₄²⁻，苹果酸脱氢酶进一步催化草酰乙酸和 NADH 生成苹果酸和 NAD⁺，在 340nm 测定 NADH 减少速率，计算 PEPC 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。





需自备的仪器和用品:

紫外分光光度计/酶标仪、台式离心机、水浴锅、微量石英比色皿/96孔UV板、可调式移液枪、研钵/匀浆器/细胞超声破碎仪、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，然后，8000g，4℃，离心20min。

2、细菌或细胞：按照细菌或细胞数量(10^4 个):提取液体积(mL)为500~1000:1的比例（建议500万细胞加入1mL提取液），冰浴超声波破碎细胞（功率300w，超声3秒，间隔7秒，总时间3min）；然后8000g，4℃，离心20min，取上清置于冰上待测。

3、血清（浆）等液体：直接检测。若有浑浊则离心后取上清测定。

二、测定步骤

1、分光光度计/酶标仪预热30min以上，调节波长至340nm，分光光度计蒸馏水调零。

2、根据样本量取部分试剂一和工作液置于30℃平衡10min。

3、操作表（在微量石英比色皿/96孔UV板中分别加入下列试剂）:

试剂名称(μL)	测定管	空白管
试剂一	90	90
工作液	90	90
样本	20	-
蒸馏水	-	20

在微量石英比色皿/96孔UV板中分别加入上述试剂，充分混匀后于340nm处测定10s时的吸光值A1，迅速置于30℃水浴或培养箱5min（酶标仪有控温功能的可将温度调至30℃），拿出迅速擦干测定310s时的吸光值A2，计算 ΔA 测定管=A1测定-A2测定， ΔA 空白管=A1空白-A2空白， $\Delta A = \Delta A$ 测定管- ΔA 空白管。（空白管只需做1-2次）

三、PEPC酶活计算

1、按微量石英比色皿计算:

(1) 按蛋白浓度计算

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

$$\text{PEPC 酶活 (U/mg prot)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 321 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

(2) 按样本质量计算

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

$$\text{PEPC 酶活 (U/g 质量)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times W \div V_{\text{样总}}) \div T = 321 \times \Delta A \div W$$

(3) 按细菌或细胞数量计算

酶活定义：每 10^4 个细菌或细胞每分钟消耗1nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{PEPC 酶活 (U/10}^4\text{ cell)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times N) \div T = 321 \times \Delta A \div N$$

ϵ : NADH 摩尔消光系数, $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$; d : 微量石英比色皿光径, 1cm; $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, $2 \times 10^{-4} \text{ L}$; $V_{\text{样}}$: 反应体系中样本体积, 0.02mL; C_{pr} : 样本蛋白浓度, mg/mL; W : 样本质量, g; $V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积, 1mL; T : 反应时间: 5min; 10^9 : 单位换算系数, $1 \text{ mol} = 10^9 \text{ nmol}$; N : 细胞数量, 以万计。



2、按 96 孔 UV 板计算:

将上述公式中的 d-1cm 改为 d-0.6cm (96 孔 UV 板光径) 进行计算即可。

注意事项:

- 1、为保证实验结果的准确性,需先取 1-2 个样做预实验, ΔA 大于 0.6 时,建议将粗酶液用提取液稀释后再进行测定。当 ΔA 小于 0.01 时,可以延长反应时间 (10min 或 15min) 来测定。
- 2、空白管为检测各试剂组分质量的检测孔,正常情况下,变化不超过 0.02。

实验实例:

- 1、取 0.1g 天竺葵叶片加入 1mL 提取液进行匀浆研磨,取上清之后按照测定步骤操作,使用微量石英比色皿测得
计算 ΔA 测定= A_1 测定- A_2 测定= $1.013-0.9753=0.0377$, ΔA 空白= A_1 空白- A_2 空白= $0.8407-0.8392=0.0015$,
 $\Delta A = \Delta A$ 测定- ΔA 空白= $0.0377-0.0015=0.0362$,按样本质量计算酶活:
PEPC 酶活 (U/g 质量) = $321 \times \Delta A \div W = 321 \times 0.0362 \div 0.1 = 116.202$ U/g 质量。
- 2、取 0.1g 芦荟叶片加入 1mL 提取液进行匀浆研磨,取上清之后按照测定步骤操作,使用微量石英比色皿测得计算 ΔA 测定= A_1 测定- A_2 测定= $0.7049-0.6699=0.035$, ΔA 空白= A_1 空白- A_2 空白= $0.8407-0.8392=0.0015$, $\Delta A = \Delta A$ 测定- ΔA 空白= $0.035-0.0015=0.0335$,按样本质量计算酶活:
PEPC 酶活 (U/g 质量) = $321 \times \Delta A \div W = 321 \times 0.0335 \div 0.1 = 107.535$ U/g 质量。

相关发表文献:

- [1] Kayoumu M, Iqbal A, Muhammad N, Li X, Li L, Wang X, Gui H, Qi Q, Ruan S, Guo R, Zhang X, Song M, Dong Q. Phosphorus Availability Affects the Photosynthesis and Antioxidant System of Contrasting Low-P-Tolerant Cotton Genotypes. *Antioxidants (Basel)*. 2023 Feb 12;12(2):466. doi: 10.3390/antiox12020466. PMID: 36830024; PMCID: PMC9952849.
- [2] Ali MM, Anwar R, Rehman RNU, Ejaz S, Ali S, Yousef AF, Ercisli S, Hu X, Hou Y, Chen F. Sugar and acid profile of loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.), enzymes assay and expression profiling of their metabolism-related genes as influenced by exogenously applied boron. *Front Plant Sci*. 2022 Oct 20;13:1039360. doi: 10.3389/fpls.2022.1039360. PMID: 36340346; PMCID: PMC9632665.
- [3] Yang Q, Cai D, Chen W, Chen H, Luo W. Combined metabolic analyses for the biosynthesis pathway of l-threonine in *Escherichia coli*. *Front Bioeng Biotechnol*. 2022 Sep 9;10:1010931. doi: 10.3389/fbioe.2022.1010931. PMID: 36159692; PMCID: PMC9500239.
- [4] Hu Y, Zhang P, Zhang X, Liu Y, Feng S, Guo D, Nadezhda T, Song Z, Dang X. Multi-Wall Carbon Nanotubes Promote the Growth of Maize (*Zea mays*) by Regulating Carbon and Nitrogen Metabolism in Leaves. *J Agric Food Chem*. 2021 May 5;69(17):4981-4991. doi: 10.1021/acs.jafc.1c00733. Epub 2021 Apr 26. PMID: 33900073.
- [5] Chen W, Zhou M, Zhao M, Chen R, Tigabu M, Wu P, Li M, Ma X. Transcriptome analysis provides insights into the root response of Chinese fir to phosphorus deficiency. *BMC Plant Biol*. 2021 Nov 10;21(1):525. doi: 10.1186/s12870-021-03245-6. PMID: 34758730; PMCID: PMC8579613.

参考文献:





[1] Zhang Y H, Wang Z M, Huang Q, et al. Phosphoenolpyruvate carboxylase activity in ear organs is related to protein concentration in grains of winter wheat[J]. Journal of cereal science, 2008, 47(2): 386-391.

相关系列产品:

BC0740/BC0745 己糖激酶 (HK) 活性检测试剂盒

BC0540/BC0545 丙酮酸激酶 (PK) 活性检测试剂盒

BC0530/BC0535 磷酸果糖激酶 (PFK) 活性检测试剂盒

