

丙酮酸磷酸双激酶 (PPDK)试剂盒说明书

微量法 100 管/96 样

注 意：正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义：

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。

测定原理：

PPDK 的逆向反应催化磷酸烯醇式丙酮酸、AMP 和 PPi 生成丙酮酸、ATP 和 Pi，乳酸脱氢酶进一步催化丙酮酸和 NADH 生成乳酸和 NAD⁺，在 340nm 测定 NADH 减少速率，计算 PPDK 活性。

需自备的仪器和用品：

紫外分光光度计/酶标仪、台式离心机、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔板、研钵、冰和蒸馏水。

试剂的组成和配制：

提取液：100mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂一：液体 25 mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂二：粉剂×2 瓶，-20℃ 保存；

试剂三：液体 40μL×1 支，4℃ 保存；体积较少，若沾在管壁上，临用前可低速离心后使用。

样本的前处理：

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。8000g 4℃ 离心 10min，取上清，置冰上待测。

测定步骤和加样表：

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

2、样本测定

(1) 工作液的配制：临用前取试剂二一瓶加入 10mL 试剂一和 5μL 试剂三，充分混匀，置于 37℃ 水浴 5min；用不完的试剂分装后 -20℃ 保存，禁止反复冻融。

(2) 在微量石英比色皿或 96 孔板中加入 10μL 样本和 190μL 工作液，混匀，立即记录 340nm 处初始吸光值 A1 和 37℃ 反应 5min 后的吸光值 A2，计算 $\Delta A = A1 - A2$ 。

PPDK 活性计算：

a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

(1) 按样本蛋白浓度计算

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

$$PPDK \text{ (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V \text{ 样} \times C_{pr}) \div T = 643 \times \Delta A \div C_{pr}$$

(2) 按样本鲜重计算

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

$$PPDK \text{ (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 643 \times \Delta A \div W$$

V 反总：反应体系总体积，2×10⁻⁴ L；ε：NADH 摩尔消光系数，6.22×10³ L / mol /cm；d：比色皿光径，1cm；V 样：加入样本体积，0.01 mL；V 样总：加入提取液体积，1 mL；T：反应时间，5 min；C_{pr}：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；500：细菌或细胞总数，500 万。

b.用 96 孔板测定的计算公式如下**(1) 按样本蛋白浓度计算**

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

$$\text{PPDK (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 1286 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(2) 按样本鲜重计算

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

$$\text{PPDK (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1286 \times \Delta A \div W$$

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：96 孔板光径，0.5cm；V 样：加入样本体积，0.01 mL；V 样总：加入提取液体积，1 mL；T：反应时间，5 min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g。

