

丙酮酸磷酸双激酶 (PPDK)试剂盒说明书

分光光度法 50 管/48 样

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、台式离心机、可调式移液器、1mL 石英比色皿、研钵、冰和蒸馏水。

试剂的组成和配制:

提取液: 60mL×1 瓶, 4℃ 保存;

试剂一: 液体 60 mL×1 瓶, 4℃ 保存;

试剂二: 粉剂×2 瓶, -20℃ 保存;

试剂三: 液体 60μL×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 25mL 试剂一和 12.5μL 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 1mL 石英比色皿中加入 50μL 样本和 950μL 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:

(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。

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

(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, 1×10⁻³ 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, 0.05mL; 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。