

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。

组成：

产品名称	PSS022-50T/48S	Storage
提取液：液体	60ml	4°C
试剂一：液体	60ml	4°C
试剂二：粉剂	2 瓶	-20°C
试剂三：液体	60μl	4°C

试剂三：液体 60μl×1 支，4°C 保存；体积较少，若沾在管壁上，临用前可低速离心后使用。

自备仪器和用品：

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。

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°C 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°C 水浴 5min；用不完的试剂分装后 -20°C 保存，禁止反复冻融。



(2) 在 1ml 石英比色皿中加入 50 μ l 样本和 950 μ l 工作液，混匀，立即记录 340nm 处初始吸光值 A1 和 37 $^{\circ}$ C 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。

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

(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。

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

$V_{\text{反总}}$ ：反应体系总体积， 1×10^{-3} L； ϵ ：NADH 摩尔消光系数， 6.22×10^3 L / mol / cm； d ：比色皿光径，1cm； $V_{\text{样}}$ ：加入样本体积，0.05ml； $V_{\text{样总}}$ ：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。

