

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

产品货号: GBQ186

产品规格: 48T(48 samples)/96T(96 samples)

检测仪器: 酶标仪(320-360 nm)

Elabscience®磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 (PEPC)

比色法测试盒

Phosphoenolpyruvate Carboxylase (PEPC)

Activity Assay Kit

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话: 400-999-2100

邮箱: biochemical@elabscience.cn

网址: www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。

联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

用途

本试剂盒适用于检测植物组织样本中的磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶（PEPC）的酶活。

检测原理

磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶（PEPC）催化磷酸烯醇式丙酮酸（PEP）生成草酰乙酸，与 NADH 进一步反应，NADH 在 340 nm 有最大吸收，对比反应前与反应后 OD 值变化能够计算出该酶酶活。

本试剂盒检测植物组织样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用考马斯亮蓝法。（货号：GBQ129）。

提供试剂和物品

编号	名称	规格 1 (Size 1)(48 T)	规格 2 (Size 2)(96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	缓冲液 (Buffer Solution)	13 mL×1 瓶	25 mL×1 瓶	2-8℃ 避光 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	底物 (Substrate)	粉剂×2 瓶	粉剂×4 瓶	2-8℃ 避光 保存 6 个月
	96 孔紫外酶标板	96 孔×1 块		无要求
	96 孔覆膜	2 张		
	样本位置标记表	1 张		

说明：试剂严格按上表中的保存条件保存，不同测试盒中的试剂不能混用。
对于体积较少的试剂，使用前请先离心，以免量取不到足够量的试剂。

所需自备物品

仪器：酶标仪(波长 320-360 nm，最佳检测波长 340 nm)、37℃ 恒温培养箱。
试剂：PBS（0.01 M，pH 7.4）

试剂准备

- ① 检测前，试剂盒中的试剂平衡至室温。
- ② 工作液的配制：
取一瓶试剂二，加入6 mL试剂一溶解混匀，2-8℃避光可保存3天。

样本准备

- ① 样本处理
组织样本：按照组织样本质量（g）：PBS（0.01 M，pH 7.4）体积（mL）=1：9的比例匀浆，4℃，10000 × g离心10 min，取上清液，如上清仍有浑浊，可再次离心，2-8℃保存待测，留取部分上清，进行蛋白浓度测定。
- ② 样本的稀释
在正式检测前，需选择2-3个预期差异大的样本稀释成不同浓度进行预实验，根据预实验的结果，结合本试剂盒的线性范围：0.72-25.61 U/L，请参考下表稀释(仅供参考)：

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
10%小白菜组织	不稀释	10%娃娃菜组织	不稀释
10%茼蒿组织	不稀释	10%红薯叶组织	不稀释

注：稀释液为 PBS（0.01 M，pH 7.4）。

实验关键点

建议取用新鲜植物样本测定。

操作步骤

- ① 测定孔中加入 40 μL 待测样本。
- ② 向步骤①中加入 200 μL 工作液，振板，室温静置 1 min，于 340 nm 处测定 OD 值 A₁。
- ③ 37°C 孵育 10 min，测定 OD 值 A₂， $\Delta A_{340} = A_1 - A_2$ 。

操作表

	测定孔
待测样本(μL)	40
工作液(μL)	200
振板，室温静置 1 min，于 340 nm 处测定 OD 值 A ₁	
37°C 孵育 10 min，测定 OD 值 A ₂ ， $\Delta A_{340} = A_1 - A_2$ 。	

本试剂盒检测植物组织样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用考马斯亮蓝法。（货号：GBQ129）。

结果计算

组织样本中磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶（PEPC）酶活计算公式：

酶活定义：37℃ 条件下，每克组织蛋白在反应体系中每分钟消耗 1 μmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{PEPC 活力 (U/gprot)} = \Delta A_{340} \div (\epsilon \times d) \times 10^6 \times V_{\text{总}} \div V_{\text{样}} \div C_{\text{pr}} \times f \div T$$

注解：

ΔA_{340} ：样本的绝对 OD 值（ $\Delta A_{340} = A_1 - A_2$ ）

ϵ ：NADH 在 340 nm 处的摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$

d ：96 孔板光径，0.6 cm

10^6 ：单位换算系数， $1 \text{ mol} = 10^6 \mu\text{mol}$

$V_{\text{总}}$ ：反应体系总体积，0.24 mL

$V_{\text{样}}$ ：反应体系中样本体积，0.04 mL

C_{pr} ：匀浆后样本蛋白浓度，gprot/L

f ：样本加入检测体系前的稀释倍数

T ：反应时间，10 min

附录1 关键数据

1. 技术参数

检测范围	0.72-25.61 U/L	批间差	8.5-10.6 %
检测灵敏度	0.72 U/L	批内差	1.5-4.3 %
稀释回收率	96-111 %		

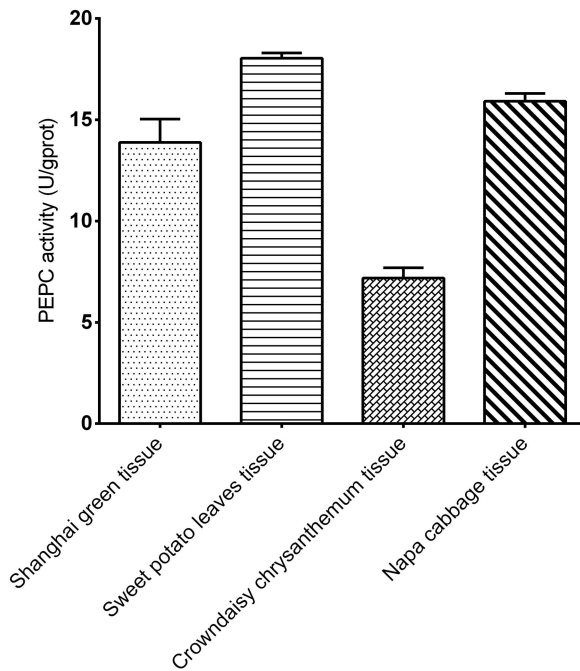
附录2 实例分析

例如检测小白菜组织(数据仅供参考):

取10%小白菜组织匀浆上清液40 μL , 按操作表操作, 结果如下: OD值 A_1 为1.349, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育10 min, OD值 A_2 为1.244, $\Delta A_{340} = 1.349 - 1.244 = 0.105$, 10%小白菜组织匀浆蛋白浓度为3.03 gprot/L, 计算结果为:

$$\begin{aligned}\text{PEPC活力(U/gprot)} &= 0.105 \div (6.22 \times 10^{-3} \times 0.6) \times 10^6 \times 0.24 \div 0.04 \div 3.03 \times 10 \div 10 \\ &= 55.71 \text{ U/gprot}\end{aligned}$$

按说明书操作, 测定小白菜组织上清液(10%组织匀浆蛋白浓度3.03 gprot/L, 加样量40 μL)、红薯叶组织上清液(10%组织匀浆蛋白浓度1.75 gprot/L, 加样量40 μL)、茼蒿组织上清液(10%组织匀浆蛋白浓度1.40 gprot/L, 加样量40 μL)、娃娃菜组织上清液(10%组织匀浆蛋白浓度0.92 gprot/L, 加样量40 μL)中的PEPC活力(如下图):



附录3 问题答疑

问题	可能原因	建议解决方案
样本测不出值	样本不新鲜	取新鲜样本，重新检测
	样本清液中有悬浮	重新取样本 12000 × g 再次离心

声明

1. 试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，我公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器，严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责，使用前请充分考虑样本可能的使用量，预留充足的样本。

