

磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(PEPC)测试盒

紫外比色法 50T/48 样

一、测定原理

PEPC 催化磷酸烯醇式丙酮酸和二氧化碳生成草酰乙酸和磷酸氢离子,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, 从而计算 PEPC 活性。

二、自备仪器用品

台式离心机、紫外分光光度计、1ml 石英比色皿、移液枪、研钵、冰和蒸馏水

三、试剂组成和配制

提取液 60ml×1 瓶, 4℃ 保存

试剂一 30ml×1 瓶, 4℃ 保存

试剂二 10ml×1 瓶, 4℃ 保存

试剂三 粉剂×1 支, -20℃ 保存, 临用前加 8ml 蒸馏水充分溶解, 用不完的试剂 4℃ 保存一周

试剂四 粉剂×1 支, -20℃ 保存, 临用前加 5ml 蒸馏水充分溶解, 用不完的试剂 4℃ 保存一周

试剂五 20 μl 原液×1 支, 4℃ 保存

试剂五 10ml 稀释液×1 瓶, 4℃ 保存

四、样品前处理

样本提取详见试剂盒内说明书。测定细菌、组织和细胞时需要测定蛋白浓度。可用总蛋白定量测试盒(考马斯亮蓝法)或者总蛋白定量测试盒(BCA 法)进行蛋白浓度的测定。

五、测定步骤

- 1、分光光度计预热 30min 以上, 调节波长到 340nm, 用蒸馏水调零。
- 2、试剂五工作液的配置: 将试剂五原液: 试剂五稀释液=1:329 稀释, 用多少配多少。
- 3、将试剂一、二、三、四和试剂五工作液置于 37° C (哺乳动物) 或 25° C (其他物种) 预热 5 分钟。

4、加样表

试剂名称 (μl)	测定管
试剂一	500
试剂一	150
试剂一	150
试剂一	95
试剂五工作液	95

样本	20
将上述试剂按照顺序加入 1ml 石英比色皿中，立即混匀，加△样本的同时开始计时，记录在 340nm 波长下的初始吸光度 A1 和 5 分钟后的吸光度 A2，计算 $A = A1 - A2$ 。	