

磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶 (PEPCK)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:

PEPCK (EC 4.1.1.32) 广泛存在于动物、植物、微生物和细胞中, 催化草酰乙酸转化为磷酸烯醇式丙酮酸, 是调节糖异生途径的关键酶。

测定原理:

PEPCK 催化草酰乙酸生成磷酸烯醇式丙酮酸和 CO_2 , 丙酮酸激酶和乳酸脱氢酶进一步依次催化 NADH 氧化生成 NAD^+ , 在 340nm 下测定 NADH 下降速率, 即可反映 PEPCK 活性。

组成:

产品名称	SGD001-50T/48S	Storage
提取液: 酸性提取液	60ml	4°C
试剂一: 液体	45ml	4°C
试剂二: 液体	41 μ l	4°C
试剂三: 粉剂	1 支	-20°C
试剂四: 粉剂	1 支	-20°C
说明书	一份	

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、1 μ l 石英比色皿、研钵、冰和蒸馏水。

样本的前处理:

- 1、细菌或培养细胞: 先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 按照细菌或细胞数量 (10^4 个): 提取液体积 (μ l) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 500 万细菌或细胞加入 1 μ l 提取液), 超声波破碎细菌或细胞 (冰浴, 功率 20% 或 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次); 8000g 4°C 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。
- 2、组织: 按照组织质量 (g): 提取液体积(μ l)为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1 μ l 提取液), 进行冰浴匀浆。8000g 4°C 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。
- 3、血清 (浆) 样品: 直接检测。

测定步骤:

最终解释权所有 © 伊势久 (江苏连云港) 生物科技有限责任公司, 保留一切权利



- 1、分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 340nm，蒸馏水调零。
- 2、工作液的配制：临用前将试剂二和试剂三转移到试剂一中混合溶解待用；用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融。
- 3、试剂四的配制：临用前加入 2.5μl 蒸馏水充分溶解待用；用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融。
- 4、将工作液和试剂四置于 37℃(哺乳动物)或 25℃(其它物种)预热 5 分钟。
- 5、在 1μl 石英比色皿中加入 50μl 样本、50μl 试剂四和 900μl 工作液，立即混匀，记录 340nm 处初始吸光值 A1 和 1min 后的吸光值 A2，计算 $\Delta A=A1-A2$ 。

注意：在该试剂盒中，若 ΔA 大于 0.1，需将样本用提取液稀释适当倍数后测定，使 ΔA 小于 0.1 可提高检测灵敏度。计算公式中乘以相应稀释倍数。

PEPCK 活性计算：

1、血清（浆）PEPCK 活力计算

单位定义：每毫升血清（浆）每分钟消耗 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{PEPCK (nmol/min/}\mu\text{l)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 3215 \times \Delta A$$

2、组织、细菌或细胞中 PEPCK 活力计算

(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。

$$\text{PEPCK (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 3215 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

(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。

$$\text{PEPCK (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 3215 \times \Delta A \div W$$

(3) 按细菌或细胞密度计算：

单位定义：每 1 万个细胞每分钟消耗 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{PEPCK (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 6.43 \times \Delta A$$

V 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 样：加入样本体积，0.05 μl；V 样总：加入提取液体积，1 μl；T：反应时间，1 min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/μl；W：样本质量，g；500：细菌或细胞总数，500 万。

