

磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶 (PEPCK)试剂盒说明书

微量法 100 管/96 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 | SGD002-100T/96S | Storage |
|--------|-----------------|---------|
| 提取液：液体 | 100ml | 4°C |
| 试剂一：液体 | 18ml | 4°C |
| 试剂二：液体 | 16.5 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：

分光光度计/酶标仪、台式离心机、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔板、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 (ml) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 500 万细菌或细胞加入 1ml 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 (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。
- 3、血清 (浆) 样品：直接检测。

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



测定步骤:

- 1、分光光度计或酶标仪预热 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 1ml 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、在微量石英比色皿或 96 孔板中加入 10μl 样本、10μl 试剂四和 180μl 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:

a.用微量石英比色皿测定的计算公式如下

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。

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

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。

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

(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, 2×10^{-4} 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, 0.01 ml; V 样总: 加入提取液体积, 1 ml; T: 反应时间, 1 min; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/ml; W: 样本质量, g; 500: 细菌或细胞总数, 500 万。

b.用 96 孔板测定的计算公式如下

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。

$$\text{PEPCK (nmol/min/ml)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 6430 \times \Delta A$$

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。

$$\text{PEPCK (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 6430 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(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。

$$\text{PEPCK (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 6430 \times \Delta A \div W$$

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



(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。

$$\text{PEPCK (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 12.86 \times \Delta A$$

$V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, 2×10^{-4} L; ϵ : NADH 摩尔消光系数, 6.22×10^3 L / mol / cm; d : 96 孔板光径, 0.5cm;

$V_{\text{样}}$: 加入样本体积, 0.01 ml; $V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积, 1 ml; T : 反应时间, 1 min; C_{pr} : 样本蛋白质浓度, mg/ml; W : 样本质量, g; 500: 细菌或细胞总数, 500 万。

