

上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0534

Size: 100T/96S

磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶 (PEPCK) 检测试剂盒说明书

微量法

*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

一、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。

二、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。

三、需自备的仪器和用品:

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(ZC-1036: UV 板)、研钵、冰和蒸馏水。

四、试剂的组成和配置:

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液	100mL × 1 瓶	4°C 保存	
试剂一	液体 18 mL × 1 瓶	4°C 保存	
试剂二	液体 × 1 支	4°C 保存	
试剂三	粉剂 × 1 支	-20°C 保存	
试剂四	粉剂 × 1 支	-20°C 保存	

五、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℃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℃离心 10min，取上清，置冰上待测。
- 3、血清（浆）样品：直接检测。

六、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；现配现用；
- 3、试剂四的配制：临用前加入 1mL 蒸馏水充分溶解待用；现配现用；
- 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（UV 板）中加入 10 μ L 样本、10 μ L 试剂四和 180 μ L 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。

七、PEPCK 活性计算：

● 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 1nmol 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。

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

(2) 按样本鲜重计算

单位定义：每 g 组织每分钟消耗 1nmol 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 1nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

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

$V_{\text{反总}}$ ：反应体系总体积， $2 \times 10^{-4}\text{L}$ ； ϵ ：NADH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3\text{L/mol/cm}$ ； d ：比色皿光径，1cm； $V_{\text{样}}$ ：加入样本体积，0.01 mL； $V_{\text{样总}}$ ：加入提取液体积，1mL； 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。

● 用 96 孔板 (UV 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 1nmol 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。

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

(2) 按样本鲜重计算

单位定义：每 g 组织每分钟消耗 1nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

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

(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 1nmol 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（UV 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，1mL； 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。