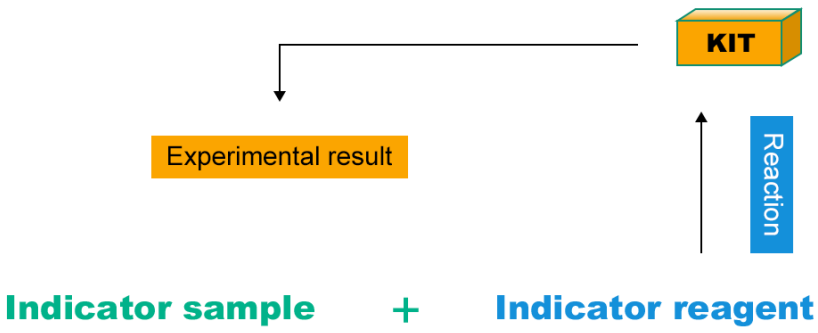
上海茁彩生物科技有限公司

ZCIBIO Technology Co.,Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO：ZC-S0674 Size：50T/48S

磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶（PEPC)检测试剂盒说明书

紫外分光光度法

***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：

PEPC（EC4.1.1.31）广泛存在于动物、植物、微生物和细胞中，是催化磷酸烯醇式丙酮酸与二氧化碳反应生成草酰乙酸呈不可逆反应的酶，对三羧酸循环的运转起重要调节作用。

二、测定原理：

PEPC 催化磷酸烯醇式丙酮酸和 CO_2 生成草酰乙酸和 HPO_4^{2-} ，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，计算 PEPC 活性。

三、需自备的仪器和用品：

紫外分光光度计、台式离心机、可调式移液器、1mL 石英比色皿、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	60mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 30mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	液体 10mL×1 瓶	4℃保存	
试剂三	粉剂×1 支	-20℃保存	临用前加入 8mL 蒸馏水充分溶解待用；现配现用
试剂四	粉剂×1 支	-20℃保存	临用前加入 5mL 蒸馏水充分溶解待用；现配现用
试剂五	粉剂×1 支	4℃保存	临用前加入 6.6ml 稀释液
稀释液	稀释液 10mL×1 瓶	4℃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、分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 340nm，蒸馏水调零。

2、将试剂一、二、三、四和试剂五工作液置于 37℃(哺乳动物)或 25℃(其它物种)预热 5 分钟。

3、加样表：

试剂名称(μL)	测定管
试剂一	500
试剂二	150
试剂三	150
试剂四	95
试剂五工作液	95
样本	20

将上述试剂按顺序加入 1 mL 石英比色皿中，立即混匀，加样本的同时开始计时，340nm 波长下记录初始吸光度 A1 和反应 5 分钟后的吸光度 A2。计算 ΔA=A1-A2。

七、注意事项：

如果一次性测定样本数较多，可将试剂一、二、三、四、和试剂五工作液按比例配成混合液。

八、PEPC 活性计算：

1、血清（浆）PEPC 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。

PEPC（nmol/min/mL））＝[ΔA×V 反总÷（ε×d）×10^9]÷V 样÷T=1624×ΔA

2、组织、细菌或细胞中 PEPC 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。

PEPC（nmol/min/mg prot）＝[ΔA×V 反总÷（ε×d）×10^9]÷(V 样×Cpr)÷T

=1624×ΔA÷Cpr

（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。

PEPC（nmol/min/g 鲜重）＝[ΔA×V 反总÷（ε×d）×10^9]÷(W×V 样÷V 样总)÷T

=1624×ΔA÷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。

PEPC（nmol/min/10^4cell）＝[ΔA×V 反总÷（ε×d）×10^9]÷(500×V 样÷V 样总)÷T

=3.248×ΔA

V反总：反应体系总体积，1.010×10^{-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，0.02 mL；V 样总：加入提取液体积，1 mL；T：反应时间，5 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。