

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-S0812

Size: 50T/48S

磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶 (PEPCK) 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:

PEPCK (EC4. 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:

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°C 保存	
试剂一	液体 45 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、分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 340nm，蒸馏水调零。

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；

试剂四的配制：临用前加入 2.5mL 蒸馏水充分溶解待用；用不完的试剂 4℃保存一周；

2、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。

3、在 1mL 石英比色皿中加入 50 μ L 样本、50 μ L 试剂四和 900 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：

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。

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

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。

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

(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。

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

(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。

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

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 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。