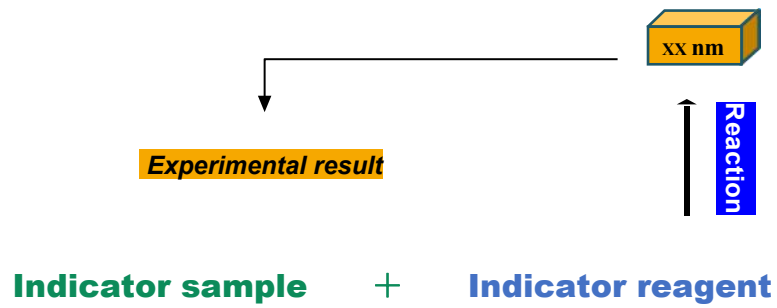


上海茁彩生物科技有限公司
Shanghai zcibio technology Co., Ltd.



生化检测原理示意图

磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶（PEPCK）测试盒说明书

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

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CO₂，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。

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（UV板）、研钵、冰和蒸馏水。

试剂的组成和配制：

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℃保存	-
试剂一	液体 18 mL×1 瓶	4℃保存	-
试剂二	液体×1 支	4℃保存	-
试剂三	粉剂×1 支	-20℃保存	-
试剂四	粉剂×1 支	-20℃保存	-

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（10⁴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。

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 μL样本、10 μL试剂四和180 μL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ΔA=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。

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

(2) 按样本鲜重计算

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

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

$V_{\text{反总}}$ ：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 ：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。

b. 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。

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

(2) 按样本鲜重计算

单位定义：每g组织每分钟消耗1nmol NADH定义为一个酶活力单位。

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

(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。