

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、研钵、冰和蒸馏水。

试剂的组成和配制：

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16.5uL×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；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 $\Delta A=A_1-A_2$ 。

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。

$$\text{PEPCK (nmol/min/104 cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 6.43 \times \Delta A$$

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。

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

(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。

$$\text{PEPCK (nmol/min/104 cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 12.86 \times \Delta A$$

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。

