

磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶（PEPCK）活性检测试剂盒说明书

微量法

货号：AC10577

规格：100T/96S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系本公司工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 110 mL×1 瓶	4°C保存
试剂一	液体 18 mL×1 瓶	4°C保存
试剂二	粉剂×1 瓶	-20°C保存
试剂三	液体 18 μL×1 支	4°C保存
试剂四	液体 62 μL×1 支	4°C保存
试剂五	粉剂×1 瓶	-20°C保存

溶液的配制：

- 1、试剂二：临用前加入 15 mL 试剂一溶解。可溶解后分装-20°C保存，避免反复冻融。
- 2、试剂三：液体置于试剂瓶内 EP 管内。临用前加入蒸馏水按体积比 1：120 稀释，现用现配。
- 3、试剂四：液体置于试剂瓶内 EP 管内。临用前加入蒸馏水按体积比 7：250 稀释，现用现配。
- 4、试剂五：粉剂置于试剂瓶内玻璃管内。临用前加入 2.5 mL 蒸馏水充分溶解；可溶解后分装-20°C保存，避免反复冻融。
- 5、工作液的配制：将试剂二、试剂三、试剂四按 7:1:1（V:V:V）的比例配制工作液，工作液现用现配。

产品说明：

PEPCK（EC 4.1.1.32）广泛存在于动物、开花植物、藻类、部分真菌和细菌中。该酶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第一限速酶。

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。

注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品：

紫外分光光度计/酶标仪、低温离心机、水浴锅、微量石英比色皿/96孔UV板、可调式移液枪、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水。

操作步骤：**一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）**

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，然后 8000g，4°C，离心 10min，取上清，置冰上待测。

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。

血清（浆）样本：直接检测。

二、测定步骤

- 1、紫外分光光度计/酶标仪预热30min以上，调节波长至340nm，蒸馏水调零。
- 2、将工作液置于37℃(哺乳动物)或25℃(其它物种)预热5分钟。
- 3、操作表：在微量石英比色皿/96孔UV板中依次加入下列试剂：

试剂名称	空白管	测定管
样本（ μL ）		10
蒸馏水（ μL ）	10	
工作液（ μL ）	180	180
试剂五（ μL ）	10	10
加入试剂五后立即混匀，于 340nm 处测定 10s 时的吸光值 A1 和 1min10s 时的吸光值 A2，计算 ΔA 测定管= A1 测定-A2 测定， ΔA 空白管=A1 空白-A2 空白， $\Delta A = \Delta A$ 测定管- ΔA 空白管（空白管只需做 1-2 次）。		

三、PEPCK酶活计算

A 按微量石英比色皿计算：

- 1、按蛋白浓度计算

酶活定义：每mg组织蛋白每分钟消耗1 nmol 的NADH定义为一个酶活力单位。

$$\text{PEPCK酶活 (U/mg prot)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 3215.4 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

- 2、按样本质量计算

酶活定义：每g组织每分钟消耗1 nmol 的NADH定义为一个酶活力单位。

$$\text{PEPCK酶活 (U/g 质量)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times W \div V_{\text{样总}}) \div T = 3215.4 \times \Delta A \div W$$

- 3、按细菌或细胞数量计算

酶活定义：每 10^4 个细菌或细胞每分钟消耗1 nmol 的NADH定义为一个酶活力单位。

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

- 4、按血清（浆）体积计算

酶活定义：每毫升血清（浆）每分钟消耗1 nmol 的NADH定义为一个酶活力单位。

$$\text{PEPCK (U/mL)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T = 3215.4 \times \Delta A$$

ϵ : NADH摩尔消光系数, $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$; d : 比色皿光径, 1cm; $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, 0.0002L; $V_{\text{样}}$: 反应体系中样本体积, 0.01mL; $V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积, 1mL; C_{pr} : 样本蛋白浓度, mg/mL, 蛋白浓度自行测定; W : 样本质量, g, T : 反应时间: 1min; 500: 细菌或细胞总数, 500万; 10^9 : 单位换算系数, $1\text{mol} = 10^9\text{nmol}$ 。

B 按96孔UV板计算：

将上述公式中的 $d=1\text{cm}$ 改为 $d=0.6\text{cm}$ （96孔板光径）进行计算即可。

注意事项:

- 1、当 A1 小于 1 或 ΔA 大于 0.6 时 (96 孔 UV 板是当 A1 小于 0.6 或 ΔA 大于 0.4 时), 建议将样本稀释适当倍数后再进行测定, 以提高检测灵敏度。
- 2、酶活性高的样本如动物肝、肾等组织, 建议将提取液稀释 5 倍或 5 倍以上测定。
- 3、空白管为检测各试剂组分质量的检测孔, 正常情况下, 变化不超过 0.06。
- 4、加样、混匀等步骤要迅速, 秒表计时要准确。

实验实例:

- 1、取 0.1g 肝脏加入 1mL 提取液进行匀浆研磨, 取上清后再用提取液稀释 2 倍, 之后按照测定步骤操作, 用微量石英比色皿测得计算 ΔA 测定管= A1 测定-A2 测定=1.1298-0.4464=0.6834, ΔA 空白管= A1 空白-A2 空白=1.3819-1.3463=0.0356, $\Delta A = \Delta A$ 测定管- ΔA 空白管=0.6834-0.0356=0.6478, 按样本质量计算酶活得:
PEPCK 酶活 (U/g 质量) = $3215.4 \times \Delta A \div W \times 2$ (稀释倍数) = $3215.4 \times 0.6478 \div 0.1 \times 2 = 41658.72$ U/g 质量。
- 2、取 0.1g 芦荟加入 1mL 提取液进行匀浆研磨, 取上清后按照测定步骤操作, 用微量石英比色皿测得计算 ΔA 测定管= A1 测定-A2 测定=1.4015-1.2665=0.135, ΔA 空白管= A1 空白-A2 空白=1.3819-1.3463=0.0356, $\Delta A = \Delta A$ 测定管- ΔA 空白管=0.135-0.0356=0.0994, 按样本质量计算酶活得:
PEPCK 酶活 (U/g 质量) = $3215.4 \times \Delta A \div W = 3215.4 \times 0.0994 \div 0.1 = 3196.108$ U/g 质量。