

# 磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶（PEPCK）活性检测试剂盒 （紫外分光光度法）

产品货号：BA1192

产品规格：50管/48样

## 产品简介：

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CO<sub>2</sub>, 丙酮酸激酶和乳酸脱氢酶进一步依次催化NADH氧化生成NAD<sup>+</sup>, 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。**

## 产品内容：

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体60mL×1瓶	2-8℃
试剂一	液体45mL×1瓶	2-8℃
试剂二	粉剂×1瓶	-20℃
试剂三	液体45μL×1支	2-8℃
试剂四	液体155μL×1支	2-8℃
试剂五	粉剂×1瓶	-20℃

## 溶液的配制：

1. 试剂二：临用前加入35mL试剂一溶解。可溶解后分装-20℃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2.5mL蒸馏水充分溶解；可溶解后分装-20℃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。

## 需自备的仪器和用品：

紫外分光光度计、低温离心机、水浴锅、1mL石英比色皿、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）：

1. 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℃，离心10min，取上清，置冰上待测。
2. 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<sup>4</sup>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。
3. 血清（浆）样品：直接检测。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q：807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com

## 二、测定步骤:

1. 紫外分光光度计预热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1mL石英比色皿中依次加入下列试剂:

试剂名称 (μL)	空白管	测定管
样本		50
蒸馏水	50	
工作液	900	900
试剂五	50	50

加入试剂五后立即混匀, 于340nm处测定初始吸光值A1和1min时的吸光值A2, 计算 $\Delta A$ 测定管=A1测定-A2测定,  $\Delta A$ 空白管=A1空白-A2空白,  $\Delta A = \Delta A$ 测定管- $\Delta A$ 空白管。空白管只需做一次。

## 三、PEPCK酶活计算:

### (1) 按蛋白浓度计算

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

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

### (2) 按样本质量计算

酶活定义: 每g组织每分钟消耗1nmol的NADH定义为一个酶活力单位。

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

### (3) 按照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1nmol的NADH定义为一个酶活力单位。

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

### (4) 按照血清(浆)体积计算

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

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

$\epsilon$ : 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, 0.001L;  $V_{\text{样}}$ : 反应体系中样本体积, 0.05mL;  $V_{\text{样总}}$ : 加入提取液体积, 1mL;  $\text{Cpr}$ : 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,  $1\text{mol} = 10^9\text{nmol}$ 。

## 注意事项:

1. 当A1小于1或 $\Delta A$ 小于0.6时, 建议将样品稀释适当倍数后再进行测定, 以提高检测灵敏度。
2. 酶活性高的样品如动物肝、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, 如果条件允许建议由两人配合完成本测定试验。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com