

ATP-磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶(ATP-PEPCK)试剂盒(微板法)

产品货号: BA3173

产品规格: 96样

产品简介:

磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶(PEPCK)属于裂解酶家族,分为两种类型:一类是ATP依赖性即ATP-PEPCK(EC 4.1.1.49),主要存在于开花植物、藻类及部分真菌和细菌中。

另一类是GTP依赖性即GTP-PEPCK(EC 4.1.1.32),主要存在于哺乳动物、鸟类、鱼类、昆虫、软体动物、扁虫、线虫、眼虫及部分真菌和细菌中。

ATP-PEPCK催化磷酸烯醇式丙酮酸生成草酰乙酸,进一步在苹果酸脱氢酶的催化下,使NADH氧化生成NAD⁺,在340nm下测定NADH下降速率,即可反映PEPCK活性。

试剂盒组分与配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体110mL×1瓶	2-8℃	
试剂一	粉剂mg×1支	2-8℃	临用前甩几下使试剂落入底部,再加3.2mL蒸馏水溶解备用。
试剂二	粉剂mg×4支	2-8℃	临用前甩几下使试剂落入底部,每支加0.3mL蒸馏水溶解备用。用不完的试剂分装后-20℃保存,禁止反复冻融,三天内用完。
试剂三	粉剂mg×1支	-20℃	临用前甩几下使试剂落入底部,再加1.1mL蒸馏水溶解备用。
试剂四	液体14mL×1瓶	2-8℃	

所需仪器和用品:

酶标仪、96孔板、台式离心机、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

ATP-磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶(ATP-PEPCK)活性测定:

建议正式实验前选取2个样本做预测定,了解本批样品情况,熟悉实验流程,避免实验样本和试剂浪费!

1. 样本制备

① 组织样本:

称取约0.1g组织,加入1mL提取液,进行冰浴匀浆。4℃×12000rpm离心10min,取上清,置冰上待测。

[注]:若增加样本量,可按照组织质量(g):提取液体积(mL)为1:5~10的比例进行提取。

② 细菌/细胞样本:

先收集细菌或细胞到离心管内,离心后弃上清;取500万细菌或细胞加入1mL提取液;冰浴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);4℃×12000rpm离心10min,取上清,置冰上待测。

[注]:也可按照细菌或细胞数量(10⁴个):提取液体积(mL)为500~1000:1的比例进行提取。

③ 液体样本:直接检测。若浑浊,离心后取上清检测。

2. 上机检测

① 酶标仪预热30min以上,调节波长为340nm。



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

② 所有试剂解冻至室温（25℃）

③ 在96孔板中依次加入：

试剂名称（μL）	测定管
试剂一	30
试剂二	10
试剂三	10
试剂四	140
样本	10
混匀，30℃条件下，立即于340nm处读取吸光值A1，5min后读取A2值， $\Delta A = A1 - A2$ 。	

【注】：

1. 若 ΔA 的值在零附近，可以适当延长反应时间到10min或更长读取A2，改变后的反应时间需代入计算公式重新计算。或适当加大样本量，则改变后的加样体积需代入计算公式重新计算。
2. 若起始值A太大如超过2（如颜色较深的植物叶片，一般色素较高，则起始值相对会偏高），可以适当减少样本加样量，则改变后的加样体积需代入计算公式重新计算。或向待测样本中加少许活性炭混匀静置5min后12000rpm，4℃离心10min，上清液用于检测。
3. 若 ΔA 大于0.6，可减少反应时间（如2min），则改变后的反应时间T代入计算公式重新计算。
4. 若下降趋势不稳定，可以每隔10S读取一次吸光值，选取一段线性下降的时间段来参与计算，相对应的A值也代入计算公式重新计算。

结果计算：

1. 按样本蛋白浓度计算：

酶活定义：每毫克组织蛋白每分钟消耗1nmol NADH定义为一个酶活力单位。

$$\text{ATP-PEPCK (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T = 1286.2 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

2. 按样本鲜重计算：

酶活定义：每克组织每分钟消耗1nmol NADH定义为一个酶活力单位。

$$\text{ATP-PEPCK (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V2] \div (W \times V1 \div V) \div T = 1286.2 \times \Delta A \div W$$

3. 按细菌/细胞密度计算：

酶活定义：每1万个细胞每分钟消耗1nmol NADH定义为一个酶活力单位。

$$\text{ATP-PEPCK (nmol/min/10}^4\text{cell)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V2] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 2.57 \times \Delta A$$

4. 按照液体计算：

酶活定义：每毫升液体每分钟消耗1nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{ATP-PEPCK (nmol/min/mL)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V2] \div V1 \div T = 1286.2 \times \Delta A$$

ϵ ---NADH摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$ ； d---96孔板光径，0.5cm；

V---加入提取液体积，1mL；

V1---加入样本体积，0.01mL；

V2---反应体系总体积， $2 \times 10^{-4} \text{ L}$ ；

T---反应时间，5min；

W---样本质量，g；

500---细菌或细胞总数，500万。

Cpr---样本蛋白质浓度，mg/mL；建议使用本公司的BCA蛋白含量检测试剂盒。



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