

磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶 (PEPCK)试剂盒说明书

分光光度法 50 管/48 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 CO_2 ，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：

紫外分光光度计、台式离心机、可调式移液器、1 mL 石英比色皿、研钵、冰和蒸馏水。

试剂的组成和配制：

提取液：60mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂一：液体 45 mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂二：液体 41 μL ×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 (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。

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 2.5mL 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 1mL 石英比色皿中加入 50 μL 样本、50 μL 试剂四和 900 μL 工作液，立即混匀，记录 340nm 处初始吸光值 A_1 和 1min 后的吸光值 A_2 ，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:

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。

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

V 反总：反应体系总体积， 1×10^{-3} 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，0.05 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。