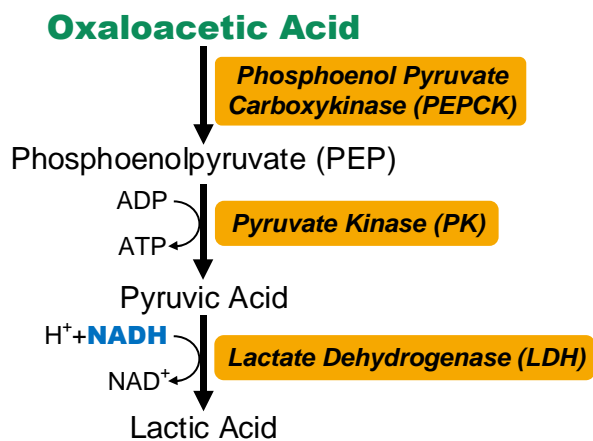




磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶 (PEPCK) 活性检测试剂盒

Phosphoenol Pyruvate Carboxykinase (PEPCK) Activity Assay Kit



北京盒子生工科技有限公司
Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.



磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶 (PEPCK) 活性检测试剂盒

Phosphoenol Pyruvate Carboxykinase (PEPCK) Activity Assay Kit

一、产品描述

磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶 (PEPCK) 是一种广泛存在于开花植物、藻类、动物、部分真菌和细菌中的双功能酶, 可通过脱羧酶或羧化酶活性对底物进行调控从而直接或间接地参与生命过程。PEPCK 催化的反应是柠檬酸循环、糖异生、氨基酸代谢等众多代谢途径的交叉枢纽, 其反应产物磷酸烯醇式丙酮酸 (PEP) 是多种有机酸、糖和脂质等代谢物的前体物质, 在机体生理代谢中发挥着关键作用。

PEPCK 能够催化草酰乙酸生成磷酸烯醇式丙酮酸和 CO_2 , 丙酮酸激酶进一步催化磷酸烯醇式丙酮酸生成丙酮酸, 再通过乳酸脱氢酶催化丙酮酸和 NADH 生成乳酸和 NAD^+ , NADH 在 340 nm 处具有特征吸收峰, 通过测定 NADH 消耗速率即可表征 PEPCK 的活性。

二、产品内容

名称	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
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 避光保存	使用前加入 15 mL 试剂一充分溶解 (分装后-20°C可保存一个月, 避免反复冻融)
试剂三	液体 18 μL ×1 支	4°C 避光保存	使用前按试剂三: 蒸馏水=1:120 的体积比配制 (根据使用量现用现配)
试剂四	液体 62 μL ×1 支	4°C 避光保存	使用前按试剂四: 蒸馏水=7:250 的体积比配制 (根据使用量现用现配)
试剂五	粉剂×1 瓶	-20°C 避光保存	使用前加入 2.5 mL 蒸馏水充分溶解 (分装后-20°C可保存一个月, 避免反复冻融)
PEPCK 工作液的配制 (现用现配): 根据使用量按试剂二: 试剂三: 试剂四=7:1:1 的体积比配制, 充分混匀即为 PEPCK 工作液。			

三、产品使用说明

测定过程中所需要的仪器和试剂: 紫外分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿 (光径 10 mm) /96 孔 UV 板、研钵/匀浆器、可调式移液器/多道移液器、台式离心机、恒温水浴/培养箱和蒸馏水。

1.粗酶液的制备（可根据预实验结果适当调整样本量及比例）

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 0.1 g 组织，加入 1 mL 提取液）处理样品，冰浴匀浆，4℃ 8000 g 离心 10 min，取上清置于冰上待测。

②细菌或细胞：离心收集细菌或细胞至离心管内，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 1 mL 提取液）处理样品，冰浴超声破碎（功率 20%或 200 W，超声 3 s，间隔 10 s，重复 30 次），4℃ 8000 g 离心 10 min，取上清置于冰上待测。

③血清（浆）、培养液等液体样本：直接检测或适当稀释后再进行检测。

2.测定步骤

①紫外分光光度计或酶标仪预热 30 min 以上，调节波长至 340 nm，蒸馏水调零。

②将 **PEPCK 工作液** 置于 37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）预热 5 min。

③在 96 孔 UV 板中依次加入下列试剂：

试剂	测定组 (μL)	空白组 (μL)
粗酶液	10	-
蒸馏水	-	10
PEPCK 工作液	180	180
试剂五	10	10

吸光值测定：①充分混匀并立即开始计时，测定 10 s（总时间）时 340 nm 处吸光值，记为 A1 测定和 A1 空白；②准确反应 60 s，测定 70 s（总时间）时 340 nm 处吸光值，记为 A2 测定和 A2 空白；③计算 ΔA 测定=A1 测定-A2 测定， ΔA 空白=A1 空白-A2 空白， $\Delta A = \Delta A$ 测定- ΔA 空白。注：空白组只需测定 1-2 次。

3.磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶（PEPCK）活性计算

3.1 使用 96 孔 UV 板测定的计算公式

①按组织样本蛋白浓度计算

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

$$\text{PEPCK (U/mg prot)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times 10^9}{\epsilon \times d_1 \times C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{6430.87 \times \Delta A}{C_{\text{pr}}}$$

②按组织样本质量计算

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。

$$\text{PEPCK (U/g)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{样总}} \times 10^9}{\epsilon \times d_1 \times W \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{6430.87 \times \Delta A}{W}$$

③按细菌或细胞数量计算

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

$$\text{PEPCK (U/10}^4 \text{ cell)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{样总}} \times 10^9}{\varepsilon \times d_1 \times \text{细菌或细胞数量} \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{6430.87 \times \Delta A}{\text{细菌或细胞数量}}$$

④按液体样本体积计算

单位定义：每 mL 液体样本每分钟消耗 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{PEPCK (U/mL)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times 10^9}{\varepsilon \times d_1 \times V_{\text{样}} \times T} = 6430.87 \times \Delta A$$

注释： $V_{\text{反总}}$ ：反应体系总体积， 2×10^{-4} L； $V_{\text{样}}$ ：反应体系中加入粗酶液的体积，0.01 mL； $V_{\text{样总}}$ ：粗酶液总体积，1 mL； ε ：NADH 摩尔消光系数， 6.22×10^3 L/mol/cm； d_1 ：96 孔 UV 板光径，0.5 cm； C_{pr} ：样本蛋白浓度，mg/mL； W ：样本质量，g；细菌或细胞数量：以万计； T ：反应时间：1 min； 10^9 ：单位换算系数， $1 \text{ mol} = 10^9 \text{ nmol}$ 。

3.2 使用微量石英比色皿测定的计算公式

将上述公式中 96 孔 UV 板光径 ($d_1 = 0.5 \text{ cm}$) 改为微量石英比色皿光径 ($d_2 = 1 \text{ cm}$) 进行计算即可。

四、注意事项

①若 A1 测定小于 1.0 或 ΔA 大于 0.6 时（96 孔 UV 板 A1 测定小于 0.6 或 ΔA 大于 0.4 时），建议将粗酶液适当稀释后再进行测定；若 ΔA 小于 0.02 建议适当增加样本量或延长反应时间后再进行测定，计算时相应修改；

②空白组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；

③准确在 10 s 和 70 s 时完成检测，以确保实验结果的准确性和重复性；若使用 96 孔 UV 板进行检测，应使用多道移液器且分批进行检测，以确保组间反应时间一致；

④为保证结果准确且避免试剂损失，测定前请仔细阅读说明书（以实际收到说明书内容为准），确认试剂储存和准备是否充分，操作步骤是否清楚，且务必取 2-3 个预期差异较大的样本进行预测定，过程中问题请您及时与工作人员联系。

For Research Use Only. Not for Use in Diagnostic Procedures.

boxbio

Manufactured and Distributed by

Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.
Liandong U Valley, Tongzhou District, Beijing, China
TEL: 400-805-8228

E-MAIL: techsupport@boxbio.cn

Copyright © 2020 Boxbio, All Rights Reserved.

