

磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶活性测定试剂盒说明书(精简版)

(货号: A130-1-1 Phosphorescent Carboxylase, 分光光度法 50T/48样)

一、测定意义

磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 (PEPC) 广泛存在于动物、植物、微生物和培养细胞中, 是催化磷酸烯醇式丙酮酸与二氧化碳反应生成草酰乙酸不可逆反应的酶, 对三羧酸循环的运转起重要调节作用。

二、测定原理

PEPC催化磷酸烯醇式丙酮酸和二氧化碳生成草酰乙酸和磷酸氢离子, 苹果酸脱氢酶进一步催化草酰乙酸和NADH生成苹果酸和NAD⁺, 在340nm测定NADH减少速率, 从而计算PEPC活性。

三、自备仪器用品

台式离心机、紫外分光光度计、1mL石英比色皿、移液枪、研钵、冰和蒸馏水

四、试剂组成和配制

- 提取液 60mL×1 瓶, 4℃保存。
 试剂一 30mL×1 瓶, 4℃保存。
 试剂二 10mL×1 瓶, 4℃保存。
 试剂三 粉剂×1 支, -20℃保存, 临用前加8mL蒸馏水充分溶解, 用不完的试剂4℃保存一周。
 试剂四 粉剂×1 支, -20℃保存, 临用前加5mL蒸馏水充分溶解, 用不完的试剂4℃保存一周。
 试剂五 20μL原液×1 支, 4℃保存。
 试剂五 10mL稀释液×1 瓶, 4℃保存。

五、样品前处理

- 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 (10⁴个): 提取液体积 (mL) 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10秒, 重复30次); 在4℃下8000g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)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

六、测定步骤

1. 分光光度计预热30min 以上, 调节波长到340nm, 用蒸馏水调零。
2. 试剂五工作液的配置: 将试剂五原液: 试剂五稀释液 =1:329稀释, 用多少配多少。
3. 将试剂一、二、三、四和试剂五工作液置于37℃ (哺乳动物) 或25℃ (其他物种) 预热5分钟。
4. 加样表:

试剂名称 (μL)	测定管
试剂一	500
试剂二	150
试剂三	150
试剂四	95
试剂五工作液	95
样本	20

将上述试剂按照顺序加入1mL石英比色皿中, 立即混匀, 加样本的同时开始计时, 记录在340nm波长下的初始吸光度A₁和5分钟后的吸光度A₂, 计算ΔA = A₁-A₂。

注意: 如果一次性测定样本数较多, 可将试剂一、二、三、四和试剂五工作液按比例配成混合液。

七、PEPC活性计算

1、血清 (浆) 活力的计算

单位的定义: 每mL 血清 (浆) 在每分钟消耗1nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$PEPC(U/mL) = [\Delta A \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 1624 \times \Delta A$$

2、组织、细菌或细胞中PFK活力计算

(1) 按组织蛋白浓度计算

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

$$PEPC(U/mg) = [\Delta A \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T = 1624 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

(2) 按样本鲜重计算

单位的定义: 每g组织每分钟消耗1nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$PEPC(U/g) = [\Delta A \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1624 \times \Delta A \div W$$

(3) 按细菌或细胞密度计算

单位的定义: 每1万个细菌或细胞每分钟消耗1nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$PEPC(U/10^4 \text{ cells}) = [\Delta A \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 3.248 \times \Delta A$$

ϵ : NADH在340nm 处摩尔吸光系数为6.22×10³L/mol/cm;

d : 比色皿光径 (cm), 1cm;

$V_{\text{反应}}$: 反应体系总体 (L), 1010μL=1.01×10⁻³L;

10⁹: 1mol=1×10⁹nmol;

C_{pr} : 上清液蛋白质浓度 (mg/mL)

$V_{\text{样}}$: 加入反应体系中上清液体积 (mL), 20μL=0.02mL;

$V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积, 1mL

T : 催化反应时间 (min), 5min。

W , 样本质量, (g)

500: 细菌或细胞总数, 500万。