

# 磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶活性测定试剂盒说明书

(货号: A131-1-1 分光光度法 50管/48样)

## 一、测定意义

磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶 (Phosphoenolpyruvate CarboxyKinase, PEPCK) 广泛存在于动物、植物、微生物和培养细胞中, 催化草酰乙酸反应生成磷酸烯醇式丙酮酸与二氧化碳, 是调节糖异生途径的关键酶。

## 二、测定原理

PEPCK催化草酰乙酸反应生成磷酸烯醇式丙酮酸与二氧化碳, 丙酮酸激酶和乳酸脱氢酶进一步催化NADH生成NAD<sup>+</sup>, 在340nm测定NADH减少速率, 从而计算PEPCK活性。

## 三、自备仪器用品

台式离心机、紫外分光光度计、1mL (1cm光径) 石英比色皿、可调式移液器、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: 22.5mL×2瓶, 4℃保存。

试剂二: 液体21μL×2支, 4℃保存。

试剂三: 粉剂×2支, -20℃保存。

试剂四: 粉剂×1支, -20℃保存; 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, 避免反复冻融。

**工作液的配置:** 临用前将1支试剂二和一支试剂三转移到试剂一中混合溶解待用; 用不完的试剂4℃保存一周。

## 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 (10<sup>4</sup>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, 蒸馏水调零。
2. 将工作液和试剂四置于37℃ (哺乳动物) 或25℃ (其他物种) 预热5分钟。
3. 操作表:

试剂 (μL)	测定管
样本	50
试剂四	50
工作液	900

将上述试剂按照顺序加入试管(或离心管)中, 立即涡旋混匀 (并开始计时), 随后迅速倒入1mL (1cm光径) 石英比色皿中, 在紫外分光光度计上340nm波长下测定初始吸光度A<sub>1</sub>和1min后的吸光度A<sub>2</sub>, 计算ΔA=A<sub>1</sub>-A<sub>2</sub>。

**注意:** 做正式试验之前请做1-2只预实验, 若ΔA>0.1, 则需将样本用提取液稀释适当倍数后测定, 使ΔA<0.1可提高样本量或是延长A<sub>2</sub>与A<sub>1</sub>的间隔时间(如2min或5min等, 变量代入公式计算)检测灵敏度。计算公式中乘以相应稀释倍数。

## 七、PEPCK活性计算

### 1、血清 (浆) 活力的计算:

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

$$PEPCK(U/mL) = [\Delta A \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 3215 \times \Delta A$$

### 2、组织、细菌或细胞中PFK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。

$$PEPCK(U/mg) = [\Delta A \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (Cpr \times V_{\text{样}}) \div T = 3215 \times \Delta A \div Cpr$$

(2) 按样本鲜重计算

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

$$PEPCK(U/g) = [\Delta A \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 3215 \times \Delta A \div W$$

(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。

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

**ε:** NADH在340nm 处摩尔吸光系数为6.22×10<sup>3</sup>L/mol/cm。

**d:** 比色皿光径 (cm), 1cm。

**V<sub>反应</sub>:** 反应体系总体 (L), 1000μL=1.00×10<sup>-3</sup>L。

**10<sup>9</sup>:** 1mol=1×10<sup>9</sup>nmol。

**Cpr:** 上清液蛋白质浓度 (mg/mL)。

**V<sub>样</sub>:** 加入反应体系中上清液体积 (mL), 50μL=0.05mL。

**V<sub>样总</sub>:** 加入提取液体积, 1mL。

**T:** 催化反应时间 (min), 1min。

**W:** 样本质量, (g)。

**500:** 细菌或细胞总数, 500万。