

ATP-磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶 (ATP-PEPCK)试剂盒

(分 光 法 4 8 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。PEPCK - ATP 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 成 和 配 制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 60mL×瓶	4℃保存	
试剂一	粉剂 mg×1 支	4℃保存	临用前甩几下使试剂落入底部，再加 6.2mL 蒸馏水溶解备用。
试剂二	粉剂 mg×4 支	4℃保存	每支加 0.6mL 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℃保存	临用前甩几下使试剂落入底部，再加 2.1mL 蒸馏水溶解备用。
试剂四	液体 30mL×1 瓶	4℃保存	

所需的仪器和用品:

紫外分光光度计、1mL 石英比色皿（光径 1cm）、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/真菌样本:

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 紫外分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 340nm，蒸馏水调零。

② 所有试剂解冻至室温 (25℃) 。

③ 在 1mL 石英比色皿中依次加入：

试剂名称 (μL)	测定管
试剂一	120
试剂二	40
试剂三	40
试剂四	560
样本	40
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。

$$\text{ATP-PEPCK (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times 10^9] \div (V_1 \times \text{Cpr}) \div T = 643.1 \times \Delta A \div \text{Cpr}。$$

2、按样本鲜重计算：

酶活定义：每克组织每分钟消耗 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{ATP-PEPCK (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_2] \div (W \times V_1 \div V) \div T = 643.1 \times \Delta A \div W。$$

3、按细菌或细胞密度计算：

酶活定义：每 1 万个细胞每分钟消耗 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{ATP-PEPCK (nmol/min/10}^4\text{cell)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_2] \div (500 \times V_1 \div V) \div T = 1.29 \times \Delta A。$$

4、按照液体计算：

酶活定义：每毫升液体每分钟消耗 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{ATP-PEPCK (nmol/min/mL)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_2] \div V_1 \div T = 643.1 \times \Delta A。$$

ϵ ---NADH 摩尔消光系数, $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$; d ---光径, 1cm;

V ---加入提取液体积, 1 mL; V_1 ---加入样本体积, 0.04mL;

V_2 ---反应体系总体积, $8 \times 10^{-4} \text{ L}$; 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。