

ATP-磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶(ATP-PEPCK)试剂盒说明书

(货号: BP10391W 微板法 96 样 有效期: 3 个月)

一、指标介绍:

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。

本试剂盒测定的是 ATP 依赖性的 PEPCK, 催化草酰乙酸和 ATP 生成磷酸烯醇式丙酮

酸和 CO₂, 接着在丙酮酸激酶和乳酸脱氢酶存在下依次催化 NADH 氧化生成 NAD⁺, 通过于 340nm 下测定 NADH 的下降速率, 即可反映 PEPCK 酶活性大小。

二、试剂盒组分与配制:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 110mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	粉剂 2 支	-20℃ 保存	每支: 1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使粉剂落入管底 (可手动甩一甩); 2. 每支再加 1.6mL 蒸馏水溶解备用; 3. 用不完的试剂分装后-20℃ 保存, 禁止反复冻融。
试剂二	粉剂 4 支	4℃ 保存	每支: 1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使粉剂落入管底 (可手动甩一甩); 2. 每支加 0.3mL 蒸馏水溶解备用; 3. 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 2 支	-20℃ 保存	每支: 1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使粉剂落入管底 (可手动甩一甩); 2. 每支再加 0.6mL 蒸馏水充分溶解备用; 3. 可分装冻存, 禁止反复冻融。
试剂四	液体 2 支	-20℃ 保存	每支: 1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使粉剂落入管底 (可手动甩一甩); 2. 每支再加 0.6mL 蒸馏水充分溶解备用; 3. 可分装冻存, 禁止反复冻融。
试剂五	液体 14mL×1 瓶	4℃ 保存	

三、实验器材:

研钵 (匀浆机)、冰盒 (制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅 (烘箱、培养箱、金属浴)、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本 (例如不同类型或分组) 进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

1、样本提取：

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 液体样本：直接检测。若浑浊，离心后取上清检测。

③ 细菌/细胞样本：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。

2、检测步骤：

① 酶标仪预热 30min 以上（等仪器过自检程序亦可），调节波长至 340nm。

② 所有试剂解冻至室温（25℃）或者于 25℃ 水浴条件下预热 15min。

③ 试剂一和二和三和四和五可按照 30:10:10:10:130 比例配成混合液（一枪加 190μL 该混合液）（该混合液用多少配多少，现配现用），在 96 孔板中依次加入：

试剂组分（μL）	测定管
样本	10
试剂一	30
试剂二	10
试剂三	10
试剂四	10
试剂五	130
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 值小于 0.01，可适当延长反应时间 T 到 10min 或更长读取 A2。或适当加大样本量 V1（如由 10μL 增至 20μL，则试剂五相应减少。）则改变后的 T 和 V1 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 A1 值低于 0.6 或 ΔA 大于 0.4，可减少反应时间（如 2min 后读取 A2 值），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。

五、结果计算：

1、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。

$$\text{ATP-PEPCK}(\text{nmol/min/g 鲜重}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V2] \div (W \times V1 \div V) \div T = 1286.2 \times \Delta A \div W$$

2、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。

$$\text{ATP-PEPCK}(\text{nmol/min/mg prot}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (V1 \times Cpr) \div T = 1286.2 \times \Delta A \div Cpr$$

3、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。

$$\text{ATP-PEPCK}(\text{nmol/min/mL}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V2] \div V1 \div T = 1286.2 \times \Delta A$$

4、按细菌/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。

$$\text{ATP-PEPCK}(\text{nmol/min}/10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_2] \div (500 \times V_1 \div V) \div T = 2.57 \times \Delta A$$

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

d ---96 孔板光径，0.5cm;

V ---加入提取液体积，1 mL;

V_1 ---加入样本体积，0.01 mL;

V_2 ---反应体系总体积， $2 \times 10^{-4} \text{ L}$;

T ---反应时间，5min;

W ---样本质量，g;

500---细菌或细胞总数，万。

C_{pr} ---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。