

ATP-磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶(ATP-PEPCK)试剂盒说明书

(货号: G0830W48 微板法 48 样)

一、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。

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:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 60mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	粉剂 mg×2 支	-20°C保存	临用前甩几下使试剂落入底部,每支再加 0.9mL 蒸馏水溶解备用。用不完的试剂分装后-20°C保存,禁止反复冻融。
试剂二	粉剂 mg×2 支	4°C保存	临用前甩几下使试剂落入底部,每支加 0.3mL 蒸馏水溶解备用。用不完的试剂分装后-20°C保存,禁止反复冻融,三天内用完。
试剂三	粉剂 mg×1 支	-20°C保存	临用前甩几下使粉剂落入底部,再加 0.6mL 蒸馏水充分溶解备用,可分装冻存,禁止反复冻融。
试剂四	粉剂 mg×1 支	-20°C保存	临用前甩几下使粉剂落入底部,再加 0.6mL 蒸馏水充分溶解备用,可分装冻存,禁止反复冻融。
试剂五	粉剂 mg×3 支	4°C保存	临用前甩几下使粉剂落入底部,每支再加 0.25mL 蒸馏水充分溶解备用,避光保存,两天内用完(试剂变色即舍弃)。
试剂六	液体 7mL×1 瓶	4°C保存	

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、台式离心机、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

四、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,了解本批样品和实验流程,避免样本和试剂浪费!

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°C×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/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°C×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 酶标仪预热 30min 以上，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 试剂二和三和四和五和六可按照 10:10:10:10:120 比例配成混合液（一枪加 160μL 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：

试剂名称（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	10
试剂六	120
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，则试剂六相应减少。）则改变后的 T 和 V1 需代入计算公式重新计算。
2. 若 A1 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。
或向待测样本上清液中加入少许活性炭混匀静置 5min 后 12000rpm, 4℃离心 10min，上清用于检测。
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。

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

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。

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

3、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。

$$\text{ATP-PEPCK}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell})=[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V2] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 2.57 \times \Delta A$$

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。

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

ϵ ---NADH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3 \text{ L}/\text{mol}/\text{cm}$ ； d---96 孔板光径，0.5cm；

V---加入提取液体积，1 mL； V1---加入样本体积，0.01 mL； T---反应时间，5min；

V2---反应体系总体积， $2 \times 10^{-4} \text{ L}$ ； 500---细菌或细胞总数，万； W---样本质量，g；

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。