

磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶（PEPC）试剂盒说明书

微量法 100管/96样

正式测定前务必取2-3个预期差异较大的样本做预测定

测定意义：

PEPC（EC 4.1.1.31）广泛存在于动物、植物、微生物和细胞中，是催化磷酸烯醇式丙酮酸与二氧化碳反应生成草酰乙酸呈不可逆反应的酶，对三羧酸循环的运转起重要调节作用。

测定原理：

PEPC催化磷酸烯醇式丙酮酸和 CO_2 生成草酰乙酸和 HPO_4^{2-} ，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，计算PEPC活性。

自备实验用品及仪器：

紫外分光光度计/酶标仪、台式离心机、可调式移液器、微量石英比色皿/96孔板、研钵、冰和蒸馏水。

试剂的组成和配制：

提取液：100mL×1瓶，4℃保存；

试剂一：液体15 mL×1瓶，4℃保存；

试剂二：粉剂×2瓶，-20℃保存；

试剂三：原液10 μL ×1支，4℃保存；

试剂三：稀释液5mL×1瓶，4℃保存；

样本的前处理：

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（ 10^4 个）：提取液体积（mL）为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10s，重复30次）；8000g 4℃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）为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。

磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶（PEPC）试剂盒说明书测定步骤和加样表：

1、分光光度计或酶标仪预热30min以上，调节波长至340nm，蒸馏水调零。

2、样本测定

（1）取试剂二瓶一瓶，加入6mL试剂一和4.2mL蒸馏水充分混匀，置于37℃（哺乳动物）或25℃（其它物种）水浴5min；**现配现用**。

（2）试剂三工作液的配制：将试剂三原液：试剂三稀释液=1 μL :329 μL 稀释，混匀，用多少配多少。

（3）在微量石英比色皿或96孔板中加入10 μL 样本、20 μL 试剂三、170 μL 试剂二，混匀，立即记录340nm处20s时的吸光值A1和5min20s后的吸光值A2，计算 $\Delta A=A1-A2$ 。

PEPC活性计算：

a.用微量石英比色皿测定的计算公式如下

1、血清（浆）PEPC活力计算

单位定义：每毫升血清（浆）每分钟消耗1 nmol NADH定义为一个酶活力单位。

$$\text{PEPC (nmol/min/mL)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 643 \times \Delta A$$

2、组织、细菌或细胞中PEPC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。

$$\text{PEPC (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 643 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

(2) 按样本鲜重计算

单位定义：每g组织每分钟消耗1 nmol NADH定义为一个酶活力单位。

$$\text{PEPC (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 643 \times \Delta A \div W$$

(3) 按细菌或细胞密度计算：

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

$$\text{PEPC (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1.286 \times \Delta A$$

V反总：反应体系总体积， 2×10^{-4} L； ϵ ：NADH摩尔消光系数， 6.22×10^3 L / mol/cm；d：比色皿光径，1cm；V样：加入样本体积，0.01 mL；V样总：加入提取液体积，1 mL；T：反应时间，5 min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；500：细菌或细胞总数，500万。

b.用96孔板测定的计算公式如下

1、血清（浆）PEPC活力计算

单位定义：每毫升血清（浆）每分钟消耗1 nmol NADH定义为一个酶活力单位。

$$\text{PEPC (nmol/min/mL)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 1286 \times \Delta A$$

2、组织、细菌或细胞中PEPC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。

$$\text{PEPC (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 1286 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

(2) 按样本鲜重计算

单位定义：每g组织每分钟消耗1 nmol NADH定义为一个酶活力单位。

$$\text{PEPC (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1286 \times \Delta A \div W$$

(3) 按细菌或细胞密度计算：

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

$$\text{PEPC (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 2.572 \times \Delta A$$

V反总：反应体系总体积， 2×10^{-4} L； ϵ ：NADH摩尔消光系数， 6.22×10^3 L / mol/cm；d：96孔板光径，0.5cm；V样：加入样本体积，0.01

mL; V样总: 加入提取液体积, 1 mL; T: 反应时间, 5 min; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量, g; 500: 细菌或细胞总数, 500万。

www.pyram.cn