磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶（PEPCK)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：

PEPCK（EC 4.1.1.32）广泛存在于动物、植物、微生物和细胞中，催化草酰乙酸转化为磷酸烯醇式丙酮酸，是调节糖异生途径的关键酶。

测定原理：

PEPCK催化草酰乙酸生成磷酸烯醇式丙酮酸和CO_2，丙酮酸激酶和乳酸脱氢酶进一步依次催化NADH氧化生成NAD^+，在340nm下测定NADH下降速率，即可反映PEPCK活性。

自备仪器和样品：

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°C保存；

试剂一：液体18 mL×1瓶， 4°C保存；

试剂二：液体16.5uL×1支，4°C保存；

试剂三：粉剂×1支， -20°C保存；

试剂四：粉剂×1支，-20°C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°C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°C离心10min，取上清，置冰上待测。

3、血清（浆）样品：直接检测。

测定步骤：

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、工作液的配制：临用前将试剂二和试剂三转移到试剂一中混合溶解待用；用不完的试剂分装后-20°C保存，禁止反复冻融。

3、试剂四的配制：临用前加入1mL蒸馏水充分溶解待用；用不完的试剂分装后-20°C保存，禁止反复冻融。

4、将工作液和试剂四置于37°C(哺乳动物)或25°C(其它物种)预热5分钟。

5、在微量石英比色皿或96孔板中加入10μL样本、10μL试剂四和180μL工作液，立即混匀，记录340nm处初始吸光值A1和 1min后的吸光值A2，计算ΔA=A1-A2。

注意：在该试剂盒中，若ΔA大于0.1，需将样本用提取液稀释适当倍数后测定，使ΔA小于0.1可提高检测灵敏度。**磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶（PEPCK)试剂盒说明书**计算公式中乘以相应稀释倍数。

PEPCK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）PEPCK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。

PEPCK（nmol/min/mL））＝[ΔA×V反总÷（ε×d）×10^9]÷V样÷T=3215×ΔA

2、组织、细菌或细胞中PEPCK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（nmol/min/mg prot）＝[ΔA×V反总÷（ε×d）×10^9]÷(V样×Cpr) ÷T=3215×ΔA÷Cpr

（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。

PEPCK（nmol/min/g 鲜重）＝[ΔA×V反总÷（ε×d）×10^9]÷(W ×V样÷V样总)÷T=3215×ΔA÷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。

PEPCK（nmol/min/10^4 cell）＝[ΔA×V反总÷（ε×d）×10^9]÷(500×V样÷V样总)÷T=6.43×ΔA

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，1 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）PEPCK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。

PEPCK（nmol/min/mL））＝[ΔA×V反总÷（ε×d）×10^9]÷V样÷T=6430×ΔA

2、组织、细菌或细胞中PEPCK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（nmol/min/mg prot）＝[ΔA×V反总÷（ε×d）×10^9]÷(V样×Cpr) ÷T=6430×ΔA÷Cpr

（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。

PEPCK（nmol/min/g 鲜重）＝[ΔA×V反总÷（ε×d）×10^9]÷(W ×V样÷V样总)÷T=6430×ΔA÷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。

PEPCK（nmol/min/10^4 cell）＝[ΔA×V反总÷（ε×d）×10^9]÷(500×V样÷V样总)÷T=12.86×ΔA

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，1 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。