

磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶 (PEPCK)检测试剂盒 (微量法)

注意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

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。

试剂组成和配制：

提取液：液体 100mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂一：液体 18 mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂二：液体 16.5uL×1 支，4℃ 保存；

试剂三：粉剂×1 支，-20℃ 保存；

试剂四：粉剂×1 支，-20℃ 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。

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℃ 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℃ 保存，禁止反复冻融。
- 4、将工作液和试剂四置于 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (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 10 μ L 样本、10 μ L 试剂四和 180 μ L 工作液，立即混匀，记录 340nm 处初始吸光值 A_1 和 1min 后的吸光值 A_2 ，计算 $\Delta A = A_1 - A_2$ 。

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。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。

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

$$= 3215 \times \Delta A$$

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。

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

$$= 3215 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(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。

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

$$= 3215 \times \Delta A \div W$$

(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。

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

$$= 6.43 \times \Delta A$$

V 反总：反应体系总体积，2×10⁻⁴ L；

ε：NADH 摩尔消光系数，6.22×10³ 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。

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

$$= 6430 \times \Delta A$$

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。

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

$$= 6430 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(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。

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

$$= 6430 \times \Delta A \div W$$

(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。

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

$$= 12.86 \times \Delta A$$

V 反总：反应体系总体积，2×10⁻⁴ L；

ε：NADH 摩尔消光系数，6.22×10³ 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。