



磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶活性检测试剂盒

PEPCK Assay Kit

紫外分光光度法

产品编号: AK479U

产品规格: 50T/48S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
ES479	60mL×1 瓶	4℃保存;
AK479-A	45 mL×1 瓶	4℃保存;
AK479-B	41μL×1 支	4℃保存;
AK479-C	粉剂×1 支	-20℃保存;
AK479-D	粉剂×1 支	-20℃保存;

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介:

意义: 磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶 (Phosphoenolpyruvate carboxykinase, 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。

原理: PEPCK 催化草酰乙酸生成磷酸烯醇式丙酮酸和 CO₂，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。

自备用品:

紫外分光光度计、台式离心机、可调式移液器、1 mL 石英比色皿、研钵、冰和蒸馏水。

样本的前处理:

- 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（10⁴ 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 ES479），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。
- 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 ES479），进行冰浴匀浆。8000g 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。
- 血清（浆）样品：直接检测。

测定步骤:

- 分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 340nm，蒸馏水调零。
- 工作液的配制：临用前将 AK479-B 和 AK479-C 转移到 AK479-A 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。
- AK479-D 的配制：临用前加入 2.5mL 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。
- 将工作液和 AK479-D 置于 37℃(哺乳动物)或 25℃(其它物种)预热 5 分钟。
- 测定操作表（在 1mL 石英比色皿中加入下列试剂）：

试剂名称	测定管 (ul)	空白管 (ul)
样本	50	
蒸馏水		50
AK479-D	50	50
工作液	900	900

立即混匀，记录 340nm 处初始吸光值 A1 和 1min 后的吸光值 A2，计算 $\Delta A = A_1 - A_2$ 测定，

$\Delta A_{\text{空白}} = A_1_{\text{空白}} - A_2_{\text{空白}}$, $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$ (空白管只需做 1-2 次)。

PEPCK 活力计算:

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。

$$\text{PEPCK (U/mL)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\varepsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 3215 \times \Delta A$$

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。

$$\text{PEPCK (U/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\varepsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 3215 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

(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。

$$\text{PEPCK (U/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\varepsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{总}}) \div T = 3215 \times \Delta A \div W$$

(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。

$$\text{PEPCK (U/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\varepsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{总}}) \div T = 6.43 \times \Delta A$$

注：V 反总：反应体系总体积， 1×10^{-3} 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，0.05 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。

※ 蛋白定量检测建议使用本公司：BCA Protein Assay Kit ([C05-02001](#))

注意：

- 若 A_1 小于 1 或 ΔA 大于 0.6，需将样本用提取液稀释适当倍数后测定，以提高检测灵敏度；计算公式中乘以相应稀释倍数。
- 加样、混匀等步骤要迅速，计时要准确，建议由两人配合完成测定。