



磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶活性检测试剂盒

PEPCK Assay Kit

微量法

产品编号: AK479M

产品规格: 100T/96S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
ES479	100mL×1 瓶	4℃保存;
AK479-A	18 mL×1 瓶	4℃保存;
AK479-B	16.5uL×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/酶标仪、台式离心机、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔板 (UV 板)、研钵、冰和蒸馏水。

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 (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。
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 ES479), 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/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 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。
3. AK479-D 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 AK479-D 置于 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其它物种) 预热 5 分钟。
5. 测定操作表 (在微量石英比色皿或 96 孔板中加入下列试剂):

试剂名称	测定管 (ul)	空白管 (ul)
样本	10	
蒸馏水		10
AK479-D	10	10
工作液	180	180

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 测定=A1 测定-A2 测定， ΔA 空白=A1 空白-A2 空白， $\Delta A = A$ 测定-A 空白（空白管只需做 1-2 次）。

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。

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

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。

$$\text{PEPCK (U/mg prot)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V \text{ 样} \times \text{Cpr}) \div T = 3215 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

（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。

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

（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。

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

注： 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。

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

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。

$$\text{PEPCK (U/mL)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V \text{ 样} \div T = 6430 \times \Delta A$$

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。

$$\text{PEPCK (U/mg prot)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V \text{ 样} \times \text{Cpr}) \div T = 6430 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

（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。

$$\text{PEPCK (U/g 鲜重)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 6430 \times \Delta A \div W$$

（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。

$$\text{PEPCK (U/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 12.86 \times \Delta A$$

注： 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。

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

注意：

1. 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。
2. 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。