

ATP-磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶(ATP-PEPCK)试剂盒

微板法 96 样

产品简介:

磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶 (PEPCK)属于裂解酶家族, 分为两种类型: 一类是 ATP 依赖性即 ATP - PEPCK (EC 4.1.1.49), 主要存在于开花植物、藻类及部分真菌和细菌中。

另一类是 GTP 依赖性即 GTP - PEPCK (EC 4.1.1.32), 主要存在于哺乳动物、鸟类、鱼类、昆虫、软体动物、扁虫、线虫、眼虫及部分真菌和细菌中。

ATP - PEPCK 催化磷酸烯醇式丙酮酸生成草酰乙酸, 进一步在苹果酸脱氢酶的催化下, 使 NADH 氧化生成 NAD⁺, 在 340nm 下测定 NADH 下降速率, 即可反映 PEPCK 活性。

试剂盒组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 110mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉剂 mg×1 支	4℃保存	临用前甩几下使试剂落入底部, 再加 3.2mL 蒸馏水溶解备用。
试剂二	粉剂 mg×4 支	4℃保存	临用前甩几下使试剂落入底部, 每支加 0.3mL 蒸馏水溶解备用。用不完的试剂分装后-20℃保存, 禁止反复冻融, 三天内用完。
试剂三	粉剂 mg×1 支	-20℃保存	临用前甩几下使试剂落入底部, 再加 1.1mL 蒸馏水溶解备用。
试剂四	液体 14mL×1 瓶	4℃保存	

所需的仪器和用品:

酶标仪、96孔板、台式离心机、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

ATP-磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶 (ATP-PEPCK) 活性测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

1、样本制备:

① 组织样本:

称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆。4°C×12000rpm 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

[注]: 若增加样本量, 可按照组织质量(g): 提取液体积(mL)为 1: 5~10 的比例进行提取。

② 细菌/细胞样本:

先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 取 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液; 冰浴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);

4°C×12000rpm 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

[注]: 也可按照细菌或细胞数量(10^4 个): 提取液体积(mL)为 500~1000: 1 的比例进行提取。

③ 液体样本: 直接检测。若浑浊, 离心后取上清检测。

2、上机检测:

① 酶标仪预热 30 min 以上, 调节波长为 340nm。

② 所有试剂解冻至室温 (25°C)

③ 在 96 孔板中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管
-----------	-----

试剂一	30
试剂二	10
试剂三	10
试剂四	140
样本	10
混匀，30℃条件下，立即于 340nm 处读取吸光值 A1，5min 后读取 A2 值， $\Delta A=A1-A2$ 。	

【注】 1.若 ΔA 的值在零附近，可以适当延长反应时间到 10min 或更长读取 A2，改变后的反应时间需代入计算公式重新计算。或适当加大样本量，则改变后的加样体积需代入计算公式重新计算。

2. 若起始值 A 太大如超过 2 (如颜色较深的植物叶片，一般色素较高，则起始值相对会偏高)，可以适当减少样本加样量，则改变后的加样体积需代入计算公式重新计算。

或向待测样本中加少许活性炭混匀静置 5min 后 12000rpm, 4℃离心 10min，上清液用于检测；

3. 若 ΔA 大于 0.6，可减少反应时间 (如 2min)，则改变后的反应时间 T 代入计算公式重新计算。

4. 若下降趋势不稳定，可以每隔 10S 读取一次吸光值，选取一段线性下降的时间段来参与计算，相对应的 A 值也代入计算公式重新计算。

结果计算：

1、按样本蛋白浓度计算：

酶活定义：每毫克组织蛋白每分钟消耗 1nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{ATP-PEPCK (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times 10^9] \div (V_1 \times C_{pr}) \div T = 1286.2 \times$$

$\Delta A \div Cpr$ 。

2、按样本鲜重计算：

酶活定义：每克组织每分钟消耗 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

ATP-PEPCK (nmol/min/g 鲜重) = $[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V2] \div (W \times V1 \div V) \div T = 1286.2 \times \Delta$

$A \div W$ 。

3、按细菌/细胞密度计算：

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

ATP-PEPCK (nmol/min/ 10^4 cell) = $[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V2] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 2.57 \times \Delta$

A 。

4、按照液体计算：

酶活定义：每毫升液体每分钟消耗 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

ATP-PEPCK (nmol/min/mL) = $[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V2] \div V1 \div T = 1286.2 \times \Delta A$

ϵ ---NADH 摩尔消光系数, 6.22×10^3 L/mol/cm; d ---96 孔板光径, 0.5cm;

V ---加入提取液体积, 1 mL; $V1$ ---加入样本体积, 0.01 mL;

$V2$ ---反应体系总体积, 2×10^{-4} L; T ---反应时间, 5min;

W ---样本质量, g; 500---细菌或细胞总数, 500 万。

Cpr ---样本蛋白质浓度, mg/mL; 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。