

ATP-磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶 (ATP-PEPCK)试剂盒说明书

(分光法 48 样)

一、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。

PEPCK-ATP 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。

二、试剂盒组分与配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 60mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	粉剂 mg×1 支	4°C保存	临用前甩几下使试剂落入底部,再加 6.2mL 蒸馏水溶解备用。
试剂二	粉剂 mg×4 支	4°C保存	临用前甩几下使试剂落入底部,每支加 0.6mL 蒸馏水溶解备用。用不完的试剂分装后-20°C 保存,禁止反复冻融,三天内用完。
试剂三	粉剂 mg×1 支	-20°C保存	临用前甩几下使试剂落入底部,再加 2.1mL 蒸馏水溶解备用。
试剂四	液体 30mL×1 瓶	4°C保存	

三、所需的仪器和用品:

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

四、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 (10⁴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 紫外分光光度计预热 30min 以上,调节波长至 340nm,蒸馏水调零。

② 所有试剂解冻至室温 (25°C)。

③ 在 1mL 石英比色皿中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管
试剂一	120
试剂二	40
试剂三	40
试剂四	560
样本	40
混匀, 30°C 条件下, 立即于 340nm 处读取吸光值 A1, 5min 后读取 A2 值, ΔA=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°C 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。

五、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。

$$\text{ATP-PEPCK (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (V1 \times Cpr) \div T = 643.1 \times \Delta A \div Cpr$$

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。

$$\text{ATP-PEPCK (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V2] \div (W \times V1 \div V) \div T = 643.1 \times \Delta A \div W$$

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。

$$\text{ATP-PEPCK (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V2] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 1.29 \times \Delta A$$

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。

$$\text{ATP-PEPCK (nmol/min/mL)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V2] \div V1 \div T = 643.1 \times \Delta A$$

ε---NADH 摩尔消光系数, 6.22×10³ L/mol/cm;

d---光径, 1cm;

V---加入提取液体积, 1 mL;

V1---加入样本体积, 0.04mL;

V2---反应体系总体积, 8×10⁻⁴ 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。