上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话：021-61312973　传真：021-55068248
网址：www.shyuanye.com
邮箱：shyysw@sina.com

磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(PEPC)活性检测试剂盒(微量法)

货号： R41835

规格： 100T/96S

保质期：6个月

产品组成及保存条件：

编号	规格	储存条件
提取液ES-07	100ml×1瓶	2-8℃保存
试剂-A	液体15ml×1瓶	2-8℃保存
试剂-B	粉剂×1支	-20℃保存
试剂-C	原液10μL×1支	2-8℃保存
试剂-D	稀释液5mL×1瓶	2-8℃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化酶 (Phosphoenolpyruvate Carboxylase, PEPC) (EC 4.1.1.31) 广泛存在于动物、植物、微生物和细胞中，是催化磷酸烯醇式丙酮酸与二氧化碳反应生成草酰乙酸呈不可逆反应的酶，对三羧酸循环的运转起重要调节作用。

原理：PEPC 催化磷酸烯醇式丙酮酸和 CO2 生成草酰乙酸和 $HPO4^{2-}$，苹果酸脱氢酶进一步催化草酰乙酸和 NADH 生成苹果酸和 NAD^{+}，在 340nm 测定 NADH 减少速率，计算 PEPC 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、研钵、冰和蒸馏水。

试剂预配制：

试剂-B：临用前加入 10mL 试剂-A 和 7ml 蒸馏水充分混匀，置于 37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）水浴 5min；现配现用。

样本前处理：

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）； 8000g4℃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，调节波长到 340 nm，蒸馏水调零。

2. 试剂-C 工作液的配制：将 试剂-C：试剂-D =1μL:329μL 稀释，混匀，用多少配多少。

3. 按顺序加入下列试剂：

试剂名称	测定管(ul)
样本	10
试剂-C	500
试剂-B	150
迅速混匀，加样本的同时开始计时，于340nm 处测定20s 吸光度A1 和反应5min20s 后的吸光度A2, 计算△A=A1-A2	

PEPC 酶活性计算公式：

a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

1. 血清（浆）PEPC 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。

PEPC (nmol/min/mL) = [ΔA×V 反总÷(ε×d)×10^9]÷V 样÷T = 643×ΔA

2. 组织、细菌或细胞中 PEPC 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。

PEPC (nmol/min/mg prot) = [ΔA×V 反总÷(ε×d)×10^9]÷(V 样×Cpr)÷T = 643×ΔA÷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。

PEPC (nmol/min/g 鲜重) = [ΔA×V 反总÷(ε×d)×10^9]÷(W ×V 样÷V 样总)÷T = 1624×ΔA÷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。

PEPC (nmol/min/10^4 cell) = [ΔA×V 反总÷(ε×d)×10^9]÷(500×V 样÷V 样总)÷T = 1.286×ΔA

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，5 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）PEPC 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。

PEPC (nmol/min/mL) = [ΔA×V 反总÷(ε×d)×10^9]÷V 样÷T = 1286×ΔA

2. 组织、细菌或细胞中 PEPC 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。

PEPC (nmol/min/mg prot) = [ΔA×V 反总÷(ε×d)×10^9]÷(V ×Cpr)÷T=1286×ΔA÷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。

PEPC (nmol/min/g 鲜重) = [ΔA×V 反总÷(ε×d)×10^9]÷(W× V 样÷V 样总)÷T= 1286×ΔA÷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。

PEPC (nmol/min/10^4 cell) = [ΔA×V 反总÷(ε×d)×10^9]÷(500×V 样÷V 样总)÷T = 2.572×ΔA

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，5 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。