



ATP-磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶(ATP-PEPCK)试剂盒

紫外分光光度法

货号: R45038-48S

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。

本试剂盒测定的是 ATP 依赖性的 PEPCK, 催化草酰乙酸和 ATP 生成磷酸烯醇式丙酮酸和 CO₂, 接着在丙酮酸激酶和乳酸脱氢酶存在下依次催化 NADH 氧化生成 NAD⁺, 通过于 340nm 下测定 NADH 的下降速率, 即可反映 PEPCK 酶活性大小。

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℃ 保存	
试剂一	粉剂 mg×2 支	-20℃ 保存	临用前甩几下使试剂落入底部, 每支再加 1.6mL 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。
试剂二	粉剂 mg×2 支	4℃ 保存	临用前甩几下使试剂落入底部, 每支加 1.2mL 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×2 支	-20℃ 保存	临用前甩几下使粉剂落入底部, 每支再加 0.6mL 蒸馏水充分溶解备用, 可分装冻存, 禁止反复冻融。
试剂四	粉剂 mg×2 支	-20℃ 保存	临用前甩几下使粉剂落入底部, 每支再加 0.6mL 蒸馏水充分溶解备用, 可分装冻存, 禁止反复冻融。
试剂五	粉剂 mg×5 支	4℃ 保存	临用前甩几下使粉剂落入底部, 每支再加 0.25mL 蒸馏水充分溶解备用, 避光保存, 两天内用完(试剂变色即舍弃)。
试剂六	液体 35mL×1 瓶	4℃ 保存	

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。



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, 了解本批样品和实验流程, 避免样本和试剂浪费!

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℃×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℃×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℃)或者于25℃水浴条件下预热15min。

③试剂二和三和四和五和六可按照40:20:20:20:600比例配成混合液(一枪加700μL 该混合液)(该混合液用多少配多少, 现配现用), 在1mL石英比色皿(光径1cm)中依次加入:

试剂名称(μL)	测定管
样本	40
试剂一	60
试剂二	40
试剂三	20
试剂四	20
试剂五	20
试剂六	600



混匀, 30℃条件下, 立即于340nm处读取吸光值A1,
5min后读取A2值, $\Delta A = A1 - A2$ 。

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。

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

2、按样本鲜重计算:

酶活定义: 每克组织每分钟消耗1nmol NADH定义为一个酶活力单位。

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

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1nmol NADH定义为一个酶活力单位。

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

4、按照液体计算:

酶活定义: 每毫升液体每分钟消耗1nmol NADH定义为一个酶活力单位。

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

ϵ ---NADH 摩尔消光系数, $6.22 \times 10^3 \text{L/mol/cm}$;

d--- 光径, 1cm;

V---加入提取液体积, 1mL;

V1---加入样本体积, 0.04mL;

T---反应时间, 5min;

V2--- 反应体系总体积, $8 \times 10^{-4} \text{L}$;



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 400-666-5481 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: 3008007435@qq.com

500--- 细菌或细胞总数, 万;

W--样本质量, g;

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。



源叶