

## ATP-磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶(ATP-PEPCK)试剂盒说明书

(货号: ADS-F-TYS001 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。

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 CO<sub>2</sub>, 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<sup>+</sup>, 通过于 340nm 下测定 NADH 的下降速率, 即可反映 PEPCK 酶活性大小。

### 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 2 支      | -20°C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°C保存, 禁止反复冻融。       |
| 试剂二  | 粉剂 2 支      | 4°C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°C保存, 禁止反复冻融, 三天内用完。 |
| 试剂三  | 粉剂 2 支      | -20°C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 2 支      | -20°C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  | 液体 35mL×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 (10<sup>4</sup>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 试剂一和二和三和四和五可按照 60:40:20:20:620 比例配成混合液（一枪加 760μL 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                                                             | 620 |
| 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  $\Delta A$  值小于 0.01，可适当延长反应时间 T 到 10min 或更长读取 A2。或适当加大样本量 V1（如由 40μL 增至 60μL，则试剂五相应减少。）则改变后的 T 和 V1 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 A1 值低于 0.6 或  $\Delta A$  大于 0.4，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。

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

### 2、按样本鲜重计算：

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

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

### 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。

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

### 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。

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

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

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， $8 \times 10^{-4} \text{ L}$ ；

T---反应时间，5min；

W---样本质量，g；

500---细菌或细胞总数，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。