

磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶（PEPCK）活性检测试剂盒说明书

产品货号	产品名称	包装规格	测定方法
AMHF3-M48	磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶（PEPCK）活性检测试剂盒	48T	微量法
AMHF3-M96		96T	

一、测定意义：

磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶（PEPCK）的测定在多个领域具有重要意义，在植物碳代谢中起重要作用，测定其活性有助于改良作物，提高产量和抗逆性。PEPCK 活性异常与糖尿病、肥胖等代谢疾病相关，测定其活性有助于诊断和监测这些疾病。PEPCK 在能量代谢中起重要作用，测定其活性可揭示细胞或组织的能量代谢状态。PEPCK 的测定在代谢研究、疾病诊断、药物研发、农业和基础研究等多个领域具有广泛应用，有助于深入理解代谢调控机制及相关疾病的病理过程。

二、测定原理：

PEPCK 催化草酰乙酸（OAA）与 GTP 反应，生成磷酸烯醇式丙酮酸（PEP）、CO₂ 和 GDP，通过偶联反应将 PEPCK 催化的反应与 NADH 的氧化过程相关联，基于酶促反应中 NADH 的氧化速率与 PEPCK 活性之间的正比关系，利用 NADH 在 340 nm 处的吸光度变化间接反映 PEPCK 活性。

三、试剂组成：

试剂名称	试剂装量(48T)	试剂装量(96T)	保存条件
提取液	液体 60mL×1 瓶	液体 110mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 10mL×1 瓶	液体 20mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	液体 5mL×1 瓶	液体 10mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂三	粉剂×1 瓶	粉剂×2 瓶	-20℃保存
试剂三的配制： 每支加 2ml 试剂一，现用现配，配完-20℃可保存一周。			
试剂四	粉剂×1 瓶	粉剂×2 瓶	-20℃保存
试剂四的配制： 每支加 2ml 试剂一，现用现配，配完-20℃可保存一周。			
试剂五	粉剂×1 支	粉剂×2 支	-20℃保存

试剂五的配制：每支加 1.2ml 水，混合均匀，现用现配，配完-20℃可保存一周。			
试剂六	粉剂×1 支	粉剂×2 支	-20℃保存
试剂六的配制：每支加 1.2ml 水，混合均匀，现用现配，配完-20℃可保存一周。			
试剂七	粉剂×1 支	粉剂×2 支	2-8℃保存
试剂七的配制：每支加 1ml 水配制成母液，使用前再将母液 10 倍稀释使用，混合均匀，现用现配。			

四、操作步骤：

样本前处理

- 组织：按照组织质量 (g) : 提取液(mL) 为 1:10 的比例（建议称取 0.1 g 组织，加入 1 mL 提取液）进行冰浴匀浆。5000 rpm, 4℃ 离心 10 min，取上清置冰上待测。
- 细菌、细胞：按照细胞数量 10⁴ 个 : 提取液体积 (mL) 500~1000:1 的比例（建议 500 万细胞加入 1 mL 提取液），冰浴超声波破碎细胞（功率 300w, 超声 3s, 间隔 7s, 总时间 3 min），5000 rpm, 4℃ 离心 10min，取上清置冰上待测。
- 血清（浆）等液体样本：直接检测或适当稀释后进行检测。

测定步骤

- 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 340nm，蒸馏水调零；
- 反应介质的配制：**现用现配，按试剂二：试剂三：试剂四=3:1:1 的比例配制，用多少配多少；
- 工作液的配制：**现用现配，按反应介质：试剂五：试剂六=3:1:1 的比例配制，用多少配多少；
- 操作表（在96孔UV板中加入以下试剂）：**

试剂名称	测定管	空白管
上清液 (μL)	10	-
蒸馏水 (μL)	-	10
工作液 (μL)	200	200
试剂七 (μL)	10	10

记录 340nm 处 20s 时吸光值 A1 和 5min20s 时的吸光值 A2, 计算 $\Delta A_{\text{测定}} = A1_{\text{测定}} - A2_{\text{测定}}$ 。 $\Delta A_{\text{空白}} = A1_{\text{空白}} - A2_{\text{空白}}$; $\Delta A = \Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}$ 。 (空白管只做 1-2 管)

五、磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶 (PEPCK) 活性计算:

1、按样本鲜重计算:

单位定义: 每克组织每分钟消耗 1nmol NADH 为一个酶活力单位。

计算公式: $\text{PEPCK (nmol/min/g)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T = 1178.6 \times \Delta A \div W$

2、按样本蛋白浓度计算:

单位定义: 每毫克蛋白每分钟消耗 1nmol NADH 为一个酶活力单位。

计算公式: $\text{PEPCK (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times Cpr) \div T = 1178.6 \times \Delta A \div Cpr$

3、按细菌或细胞数量计算:

单位定义: 每 1 万个细菌或细胞每分钟消耗 1 nmol NADH 为一个酶活力单位。

计算公式: $\text{PEPCK (nmol/min/10^4 cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times 500) \div T = 2.36 \times \Delta A$

4、按血清 (浆) 体积计算:

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

计算公式: $\text{PEPCK (nmol/min/mL)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 1178.6 \times \Delta A$

$V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, 2.2×10^{-4} L; ϵ : NADH 摩尔消光系数, 6.22×10^3 L/mol/cm; d : 96 孔 UV 板光径, 0.6cm; $V_{\text{样}}$: 加入样本体积, 0.01mL; $V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积, 1mL; T : 反应时间, 5min; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; 10^9 : 单位换算系数, $1\text{mol} = 10^9\text{nmol}$; W: 样本质量, g; 500: 细菌或细胞总数, 500 万。

六、注意事项:

为保证结果准确且避免试剂损失, 测定前请仔细阅读说明书 (以实际收到说明书内容为准), 确认试剂储存和准备是否充分, 操作步骤是否清楚, 且务必取 2-3 个预期差异较大的样本进行预测定。

【厂家信息】

生产企业: 南京陌凡生物科技有限公司

地址: 南京市栖霞区红枫科技园 A6 栋 2 层

【售后微信】



【说明书核准及修改日期】

核准日期: 2025 年 4 月 7 日

修改日期: 2025 年 4 月 7 日