

ATP-Phosphoenol Pyruvate Carboxykinase Activity Assay Kit

ATP-磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶(ATP-PEPCK)试剂盒说明书

货号: BN72035 | 方法: 微板法 | 规格: 96 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 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。

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 110mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	粉剂 mg×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 mg×4 支	4°C保存	临用前甩几下使试剂落入底部, 每支加 0.3mL 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×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 mg×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	粉剂 mg×5 支	4°C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 14mL×1 瓶	4°C保存	

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、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°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（ 10^4 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 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 340nm。

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 10:10:10:10:120 比例配成混合液（一枪加 160μL 该混合液）（该混合液用多少配多少，现配现用），在 96 孔板中依次加入：

试剂名称（μL）	测定管
样本	10
试剂一	30
试剂二	10
试剂三	10
试剂四	10
试剂五	10
试剂六	120
混匀，30℃条件下，立即于 340nm 处读取吸光值 A1，5min 后读取 A2 值， $\Delta A = A1 - A2$ 。	

注意：本操作流程适用于绝大多数常规样本检测，实验条件可根据实际样本状态适度微调；

针对特殊类型样本，我司技术支持可提供专属优化建议。

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。

$$\text{ATP-PEPCK}(\text{nmol/min/mg prot}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T = 1286.2 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

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。

$$\text{ATP-PEPCK}(\text{nmol/min/g 鲜重}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V2] \div (W \times V1 \div V) \div T = 1286.2 \times \Delta A \div W$$

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。

$$\text{ATP-PEPCK}(\text{nmol/min}/10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V2] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 2.57 \times \Delta A$$

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。

$$\text{ATP-PEPCK}(\text{nmol/min/mL}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V2] \div V1 \div T = 1286.2 \times \Delta A$$

ϵ ---NADH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$ ； d---96 孔板光径，0.5cm；

V---加入提取液体积，1 mL； V1---加入样本体积，0.01 mL； T---反应时间，5min；

V2---反应体系总体积， $2 \times 10^{-4} \text{ L}$ ； 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。