

磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶（PEPC）检测试剂盒（微量法）

货号：PMK1123

保存：-20℃避光保存 6 个月

规格：48T/96T

适用样本：血清（浆）、动植物组织、细胞、细菌

产品简介

磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶（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。本试剂盒提供了一种简单易用的比色法，用于检测各种生物样本 PEPC 活性。其原理是磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶（PEPC）催化磷酸烯醇式丙酮酸和 CO_2 生成草酰乙酸和 HPO_4^{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^+ ，NADH 在 340nm 有特征吸收峰，而 NAD^+ 没有，通过测定 340nm 光吸收下降速率，即可计算 PEPC 活性。

产品内容

试剂盒组分	规格		储存条件
	48T	96T	
提取液	50mL	100mL	4℃ 保存
试剂一	8mL	16mL	4℃ 保存
试剂二	0.85mL	1.7mL	-20℃ 避光保存
试剂三储液	5μL	10μL	-20℃ 避光保存
试剂三稀释液	2.5mL	5mL	4℃ 保存

自备耗材

酶标仪或紫外分光光度计（能测 340nm 处的吸光度）及恒温箱
96 孔 UV 板或微量石英比色皿、可调节式移液枪及枪头
低温离心机、制冰机
去离子水
匀浆器（如果是组织样本）

试剂准备

注意：各组分（小管试剂）开盖前，请先低速离心。

提取液：即用型；4℃ 保存。

试剂一：即用型；使用前，平衡到室温；4℃ 保存。

试剂二：临用前配制，用试剂一将试剂二稀释 10 倍，即取 1 倍体积的试剂二加入 9 倍体积的试剂一。

试剂三：临用前配制，用试剂三稀释液将试剂三储液 稀释 400 倍，即取 1 倍体积的试剂三储液加入 399 倍体积的试剂三稀释液。

样本制备

1. 动物组织样本：按照 0.1g 组织加入 1mL 预冷的提取液的比例，冰浴匀浆。8,000g，4℃ 离心 10min，取上清，置冰上待测。
2. 植物组织样本：按 0.1g 组织加入 1mL 预冷的提取液的比例，冰浴匀浆后超声波破碎 5min（功率 20%或 200W，超声 3s，间隔 7s，重复 30 次）。8,000g，4℃ 离心 10min，取上清，置冰上待测。

产品说明书

3. 细胞或细菌样本：收集 500 万细胞或细菌到离心管内，用冷 PBS 清洗细胞，离心后弃上清，加入 1mL 预冷的提取液，冰浴超声波破碎细胞或细菌 5min（功率 20%或 200W，超声 3s，间隔 7s，重复 30 次），然后 8,000g，4℃离心 10min，取上清液，置冰上待测。

4. 血清（浆）样本：直接检测。

注意：1. 推荐使用新鲜样本，如果不立即进行实验，样本可在-80℃保存 1 个月。如需测定蛋白浓度，推荐使用 BCA 法蛋白质定量试剂盒进行样本蛋白质浓度测定。

2. 对于脂肪含量较高的动物组织，离心后移除上层脂肪，再取上清液。

实验步骤

1. 酶标仪或紫外分光光度计预热 30min 以上，调节波长到 340nm，紫外分光光度计去离子水调零。

2. 稀释后的试剂二和试剂三置于 37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）预热 5min 以上。

3. 样本测定：在 96 孔 UV 板或微量石英比色皿中加入 10 μL 样本、20 μL 稀释后的试剂三、170 μL 稀释后的试剂二，混匀，立即记录 340nm 处 20s 时的吸光值 A_1 和 5min 20s 后的吸光值 A_2 ，计算 ΔA 测定= A_1-A_2 。

注意：1. 需使用 96 孔 UV 板或微量石英比色皿，实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果 ΔA 小于 0.001 可适当加大样本量。如果 ΔA 大于 0.5，样本可用提取液进一步稀释，计算结果乘以稀释倍数，或减少提取用样本量。

2. 测定反应的温度对测定结果有影响，请控制在 25℃（一般物种）或者 37℃（哺乳动物）。

3. 因通过反应速率计算酶活，使用 96 孔 UV 板时请根据操作速度控制一次测定的样本数（通常一次测定 4-8 个样本）。

结果计算

A. 使用 96 孔板测定的计算公式

1、血清（浆）PEPC 活力计算

单位定义：每 mL 血清（浆）在反应体系中每分钟消耗 1nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{PEPC (U/mL)} = [\Delta A \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 1286 \times \Delta A$$

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 组织蛋白在反应体系中每分钟消耗 1nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{PEPC (U/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) \div T = 1286 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

（2）按样本鲜重计算

单位定义：每 g 组织在反应体系中每分钟消耗 1nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{PEPC (U/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T = 1286 \times \Delta A \div W$$

（3）按细菌或细胞密度计算：

单位定义：每 1 万个细胞在反应体系中每分钟消耗 1nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{PEPC (U/10}^4 \text{ Cells)} = [\Delta A \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times 500) \div T = 2.572 \times \Delta A$$

ϵ ：NADH 摩尔消光系数， 6.22×10^3 mol/L/cm； $V_{\text{反应}}$ ：反应总体积，200 μL= 2×10^{-4} L； $V_{\text{样本}}$ ：加入样本体积，0.01mL； $V_{\text{样总}}$ ：加入提取液体积，1mL；cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；W：样本鲜重，g；d：96 孔板光径，0.5cm；T：反应时间，5min；500：细菌或细胞总数，500 万。

B. 使用微量玻璃比色皿测定的计算公式

将上述计算公式中的光径 d:0.5cm 调整为 d:1cm 进行计算即可。

注意事项

1. 实验过程中请穿戴实验服、口罩和乳胶手套。请按照生物实验室的国家安全规定进行实验，尤其是在检测血样或其他体液时。
2. 本试剂盒仅用于实验室科学研究，如果本试剂盒用于临床诊断或任何其他用途，我们将不对任何后果负责。
3. 本试剂盒应在有效期内使用，并严格按照说明书进行存储。
4. 不同批次号、不同厂家之间的组分不要混用；否则，可能导致结果异常。
5. 勤换吸头，避免各组分之间的交叉污染。

产品说明书

相关产品：

PMK1116 丙酮酸（PA）检测试剂盒（微量法）

PMK1120 己糖激酶（HK）检测试剂盒（微量法）

PMK1121 丙酮酸激酶（PK）检测试剂盒（微量法）

PMK1122 磷酸果糖激酶（PFK）检测试剂盒（微量法）

更多产品详情了解，请关注公众号：

