

磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶(PEPCK)测试盒

紫外比色法 50T/48 样

一、测定原理

PEPCK 催化草酰乙酸反应生成磷酸烯醇式丙酮酸与二氧化碳，丙酮酸激酶和乳酸脱氢酶进一步催化 NADH 生成 NAD⁺，在 340nm 测定 NADH 减少速率，从而计算 PEPCK 活性。

二、自备仪器用品

台式离心机、紫外分光光度计、1ml 石英比色皿、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水

三、试剂组成和配制

提取液 60ml×1 瓶, 4℃ 保存

试剂一 45ml×1 瓶, 4℃ 保存

试剂二 液体 41 μl×1 瓶, 4℃ 保存

试剂三 粉剂×1 支, -20℃ 保存

试剂四 粉剂×1 支, -20℃ 保存

工作液的配置：临用前将试剂二和试剂三转移到试剂一中混合溶解待用；用不完的试剂 4℃ 保存一周。

试剂四的配制：临用前加入 2.5ml 蒸馏水充分溶解待用；用不完的试剂 4℃ 保存一周

四、样品前处理

样本提取详见试剂盒内说明书。测定细菌、组织和细胞时需要测定蛋白浓度。可用总蛋白定量测试盒（考马斯亮蓝法）或者总蛋白定量测试盒(BCA 法)进行蛋白浓度的测定。

五、测定步骤

试剂名称 (μl)	测定管
样本	50
试剂四	50
工作液	900

将上述试剂按照顺序加入 1ml 石英比色皿中，立即混匀，加样本的同时开始计时，记录在 340nm 波长下的初始吸光度 A1 和 1 分钟后的吸光度 A2，计算 $\Delta A = A1 - A2$