

丙酮酸羧化酶 (PC)试剂盒说明书

微量法 100管/96样

正式测定前务必取2-3个预期差异较大的样本做预测定

测定意义：

丙酮酸羧化酶(pyruvate carboxylase, PC, EC 6.4.1.1)广泛存在于动物、霉菌和酵母的线粒体中，催化丙酮酸、ATP、CO₂和水生成草酰乙酸、ADP和Pi，是糖异生过程的第一个限速酶，在保证血糖的动态平衡方面起着重要的作用。

测定原理：

PC催化丙酮酸、ATP、CO₂和水生成草酰乙酸、ADP和Pi，苹果酸脱氢酶进一步催化草酰乙酸和NADH生成苹果酸和NAD⁺，在340nm下测定NADH氧化速率，即可反映PC活性。

需自备的仪器和用品：

分光光度计/酶标仪、台式离心机、可调式移液器、微量石英比色皿/96孔板、研钵、冰和蒸馏水。

试剂的组成和配制：

提取液：100mL×1瓶，4℃保存；

试剂一：液体18 mL×1瓶，4℃保存；

试剂二：液体13uL×1支，4℃保存；

试剂三：粉剂×1支，-20℃保存；

试剂四：粉剂×1支，-20℃保存；

样本的前处理

组织、细菌或细胞中胞浆蛋白与线粒体蛋白的分离：

1. 称取约0.1g组织或收集500万细菌或细胞，加入1mL提取液，用冰浴匀浆器或研钵匀浆。
2. 将匀浆600g，4℃离心5min。
3. 弃沉淀，将上清液移至另一离心管中，11000g，4℃离心10min。
4. 上清液即胞浆提取物，可用于测定从线粒体泄漏的PC（此步可选做）。
5. 在步骤④的沉淀中加入1mL提取液，超声波破碎（冰浴，功率20%或200W，超声3秒，间隔10秒，重复30次），用于线粒体PC活性测定。

测定步骤：

1. 分光光度计或酶标仪预热30min以上，调节波长至340nm，蒸馏水调零。

工作液的配制：临用前将试剂二和试剂三转移到试剂一中混合溶解待用；置于37℃(哺乳动物)或25℃(其它物种)预热5分钟；用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融。

试剂四的配制：在试剂四瓶中加入1mL蒸馏水充分溶解待用；用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融。

2. 在微量石英比色皿或96孔板中加入10μL样本、10μL试剂四和180μL工作液，立即混匀，记录340nm处初始吸光值A1和2min后的吸光值A2，计算 $\Delta A = A1 - A2$ 。

注意：在该试剂盒中，若 ΔA 大于0.5，需将样本用提取液稀释适当倍数后测定，使 ΔA 小于0.5可提高检测灵敏度。计算公式中乘以相应稀释倍数。

PC活性计算：

a.用微量石英比色皿测定的计算公式如下

(1) 按样本蛋白浓度计算

单位定义：每mg组织蛋白每分钟消耗1nmol NADH定义为一个酶活力单位。

$$PC \text{ (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 1608 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

(2) 按样本鲜重计算

单位定义：每g组织每分钟消耗1 nmol NADH定义为一个酶活力单位。

$$PC \text{ (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1608 \times \Delta A \div W$$

(3) 按细菌或细胞密度计算：

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

$$PC \text{ (nmol/min/104 cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 3.215 \times \Delta A$$

V反总：反应体系总体积， 2×10^{-4} L； ϵ ：NADH摩尔消光系数， 6.22×10^3 L / mol /cm；d：比色皿光径，1cm；V样：加入样本体积，0.01 mL；V样总：加入提取液体积，1 mL；T：反应时间，2 min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；500：细菌或细胞总数，500万。

b.用96孔板测定的计算公式如下

(1) 按样本蛋白浓度计算

单位定义：每mg组织蛋白每分钟消耗1nmol NADH定义为一个酶活力单位。

$$PC \text{ (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 3216 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

(2) 按样本鲜重计算

单位定义：每g组织每分钟消耗1 nmol NADH定义为一个酶活力单位。

$$PC \text{ (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 3216 \times \Delta A \div W$$

(3) 按细菌或细胞密度计算：

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

$$PC \text{ (nmol/min/104 cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 6.43 \times \Delta A$$

V反总：反应体系总体积， 2×10^{-4} L； ϵ ：NADH摩尔消光系数， 6.22×10^3 L / mol /cm；d：96孔板光径，0.5cm；V样：加入样本体积，0.01 mL；V样总：加入提取液体积，1 mL；T：反应时间，2 min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；500：细菌或细胞总数，500万。