

丙酮酸羧化酶 (PC)试剂盒说明书

分光光度法 50 管/48 样

注 意：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、台式离心机、可调式移液器、1 mL 石英比色皿、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 47 mL×1 瓶,4℃保存;

试剂二：液体 32.8μL×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、分光光度计预热 30min 以上,调节波长至 340nm,蒸馏水调零。
- 2、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。
- 3、试剂四的配制：在试剂四瓶中加入 2.5mL 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。
- 4、在 1mL 石英比色皿中加入 50 μL 样本、50 μL 试剂四和 900 μL 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：

(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。

$$PC \text{ (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 1608 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

(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。

$$PC \text{ (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1608 \times \Delta A \div W$$

(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。

$$PC \text{ (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 3.215 \times \Delta A$$

V 反总：反应体系总体积， 1×10^{-3} 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，0.05 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。