

丙酮酸羧化酶 (PC)试剂盒说明书

微量法 100 管/96 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/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 10 μL 样本、10 μL 试剂四和 180 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：

a. 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。

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

(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， 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。

$$PC (\text{nmol/min/mg prot}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 3216 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(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。

$$PC (\text{nmol/min/g 鲜重}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 3216 \times \Delta A \div W$$

(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。

$$PC (\text{nmol/min}/10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 6.43 \times \Delta A$$

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。