

丙酮酸羧化酶 (pyruvate carboxylase, PC)试剂盒说明书

(货号: G0873W 微板法 96 样)

一、产品简介:

丙酮酸羧化酶(PC, EC 6.4.1.1)广泛存在于动物、霉菌和酵母中,但在植物体和大部分细菌中却不含此酶,主要分布于线粒体中。丙酮酸羧化酶催化丙酮酸生成草酰乙酸,是TCA循环中草酰乙酸的回补关键酶,也是糖异生过程的第一个限速酶。

丙酮酸羧化酶(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活性大小。

二、试剂盒的组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
试剂一	液体 120mL×1 瓶	-20℃保存	
试剂二	液体 30mL×1 瓶	-20℃保存	
试剂三	液体 0.5mL×1 支	-20℃保存	
试剂四	粉剂 mg×1 支	-20℃保存	用前甩几下或离心使试剂落入底部,再加 1.1mL 蒸馏水溶解,用不完的试剂-20℃保存。
试剂五	粉剂 mg×1 支	-20℃保存	用前甩几下或离心使试剂落入底部,再加 1.1mL 蒸馏水溶解,用不完的试剂-20℃保存。
试剂六	粉剂 mg×2 支	-20℃保存	用前甩几下或离心使试剂落入底部,再加 0.55mL 蒸馏水溶解,用不完的试剂分装后-20℃保存,禁止反复冻融,三天内用完。
试剂七	液体 15mL×1 瓶	4℃保存	
试剂八	粉剂 mg×1 支	-20℃保存	用前甩几下或离心使试剂落入底部,再加 1.1mL 蒸馏水溶解备用。

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96孔板、台式离心机、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

四、丙酮酸羧化酶(PC)活性测定:

1.线粒体制备(提示:整个线粒体的提取过程须保持4℃低温环境):

- ① 称取约 0.1g 组织或收集 500 万细胞,加入 1mL 试剂一,用冰浴匀浆器或研钵匀浆,转移至离心管后于 4℃×700g 离心 10min。
- ② 弃沉淀,上清液移至另一离心管中,4℃×12000g 离心 10min。上清液即胞浆提取物,可用于测定胞浆中的泄漏的丙酮酸羧化酶(此步可选做),沉淀为线粒体。
- ③ 在沉淀(线粒体)中加入200μL试剂二和2μL试剂三,超声波破碎(冰浴,功率20%或200W,超声3s,间隔10秒,重复30次),液体置于冰上用于线粒体中丙酮酸羧化酶活性测定。

【注】:若增加样本量,可按照组织质量(g):提取液体积(mL)为1:5~10的比例进行提取,或按照细胞数量(10⁴):提取液(mL)为500~1000:1的比例进行提取。

2、上机检测：

- ① 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 340nm。
- ② 所有试剂解冻至室温（25℃）。
- ③ 在 96 孔板中依次加入：

试剂名称（ μL ）	测定管
样本	10
试剂四	10
试剂五	10
试剂六	10
试剂七	150
试剂八	10
轻轻混匀，室温（25℃）条件下，于 340nm 处读取吸光值 A1, 2min 后读取吸光值 A2, $\Delta A = A1 - A2$ 。	

- 【注】**1.若 ΔA 在零附近，可延长反应时间 T（如增至 15min）后读取 A2，或加大样本量 V1（如增至 40 μL ，则试剂七相应减少），改变后的 T 和 V1 需代入公式重新计算。
2. 若 ΔA 的值大于 0.4 或 A2 值低于 0.5，则需减少反应时间 T（如减至 1min）后读取 A2，或减少样本量 V1（如增至 10 μL ，则试剂七相应增加），改变后的 T 和 V1 需代入公式重新计算。

五、结果计算：

1、按样本蛋白浓度计算

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

$$\text{PC (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V2] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T \\ = 3215.4 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

2、按样本鲜重计算

酶活定义：每克组织每分钟消耗 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{PC (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V2] \div (W \times V1 \div V) \div T \\ = 649.6 \times \Delta A \div W$$

3、按细菌/细胞密度计算

酶活定义：每 1 万个细菌/细胞每分钟产生 1 nmol NADH 为一个酶活单位。

$$\text{PC (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 1.2992 \times \Delta A$$

V1---加入样本体积，0.01 mL；

V---加入提取液体积，0.202 mL；

V2---反应体系总体积，2 $\times 10^{-4}$ L；

d---96 孔板光径，0.5cm；

T---反应时间，2min；

W---样本质量，g；

ϵ ---NADH 摩尔消光系数，6.22 $\times 10^3$ L/mol/cm；

Cpr---蛋白质浓度，mg/mL，建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。