

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

(分光法 48 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 60mL×1 瓶	-20℃ 保存	
试剂二	液体 15mL×1 瓶	-20℃ 保存	
试剂三	液体 0.5mL×1 瓶	-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 30mL×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:

紫外分光光度计、1mL 石英比色皿(光径 1cm)、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):

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。

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丙酮酸羧化酶(此步可选做),沉淀为线粒体。

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 (10^4): 提取液 (mL) 为 500~1000: 1 的比例进行提取。

2、上机检测:

- ① 紫外分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 340nm, 蒸馏水调零。
- ② 所有试剂解冻至室温 (25℃)。
- ③ 在 1mL 石英比色皿中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管
样本	40
试剂四	20
试剂五	20
试剂六	20
试剂七	600
试剂八	20
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。

$$\text{PC (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_2] \div (V_1 \times \text{Cpr}) \div T \\ = 1447 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

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。

$$\text{PC (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_2] \div (W \times V_1 \div V) \div T \\ = 292.3 \times \Delta A \div W$$

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。

$$\text{PC (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_1 \div V) \div T = 0.585 \times \Delta A$$

V1---加入样本体积, 0.04 mL;

V---加入提取液体积, 0.202 mL;

V2---反应体系总体积, 7.2 $\times 10^{-4}$ L;

d---光径, 1cm;

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。