

## 丙酮酸羧化酶 (PC)试剂盒说明书

分光光度法 50 管/48 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、CO<sub>2</sub> 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、CO<sub>2</sub> 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<sup>+</sup>,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  $\Delta A$  大于 0.5,需将样本用提取液稀释适当倍数后测定,使  $\Delta A$  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。

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

(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,  $1 \times 10^{-3}$  L;  $\epsilon$ : NADH 摩尔消光系数,  $6.22 \times 10^3$  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。