

丙酮酸羧化酶 (PC)试剂盒说明书

微量法 100 管/96 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、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18mL×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10μL样本、10μL试剂四和180μL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.用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。

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

(2) 按样本鲜重计算

单位定义: 每 g 组织蛋白每分钟消耗 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; C_{pr}: 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。

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

(2) 按样本鲜重计算

单位定义: 每 g 组织蛋白每分钟消耗 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; C_{pr}: 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。