

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

(货号: ADS-W-TYS004 微板法 96 样 有效期: 3 个月)

### 一、指标介绍:

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、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 活性大小。

### 二、试剂盒的组成和配制:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
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℃ 避光保存	
试剂四	液体 1 支	-20℃ 保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底 (可手动甩一甩); 2. 加入 1.1mL 蒸馏水溶解, 用不完的试剂-20℃ 保存。
试剂五	粉剂 1 支	-20℃ 保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使粉剂落入管底 (可手动甩一甩); 2. 加入 1.1mL 蒸馏水溶解, 用不完的试剂-20℃ 保存。
试剂六	粉剂 2 支	-20℃ 保存	每支: 1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使粉剂落入管底 (可手动甩一甩); 2. 加入 0.55mL 蒸馏水溶解; 3. 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 1 支	-20℃ 保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使粉剂落入管底 (可手动甩一甩); 2. 加入 1.1mL 蒸馏水溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。

### 三、实验器材:

研钵 (匀浆机)、冰盒 (制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅 (烘箱、培养箱、金属浴)、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

### 四、指标测定:

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 组织样本:

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泄漏的丙酮酸羧化酶（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<sup>4</sup>）：试剂一（mL）为 500~1000：1 的比例进行提取。

②液体样本：直接检测。若浑浊，离心后取上清检测。

③ 细菌/细胞样本：先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；取 500 万细菌或细胞加入 1mL 试剂二；冰浴超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 20% 或 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；4℃×12000rpm 离心 10min，取上清，置冰上待测。

【注】：也可按照细菌或细胞数量（10<sup>4</sup> 个）：试剂二体积（mL）为 500~1000：1 的比例进行提取。

## 2、检测步骤：

① 酶标仪预热 30min 以上（等仪器过自检程序亦可），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：

试剂组分（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  $\Delta A$  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 40μL，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  $\Delta A$  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 10μL，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。

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

### 2、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。

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

### 3、按照液体计算：

酶活定义：每毫升液体每分钟消耗 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

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

### 4、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。

$$PC \text{ (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_1 \div V) \div T = 1.2992 \times \Delta A$$

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;

$\epsilon$ ---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。

500---细菌或细胞总数，万。