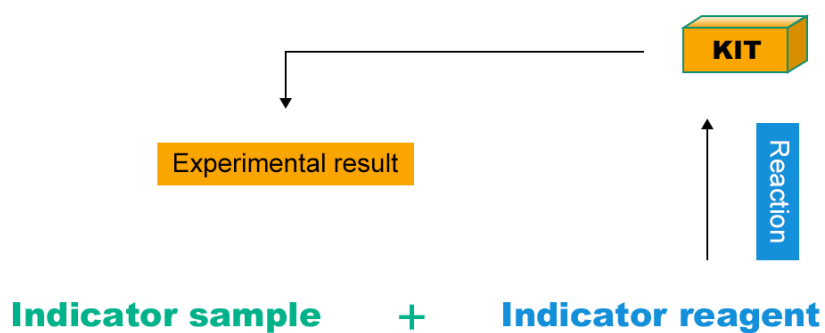


上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0815

Size: 50T/48S

丙酮酸羧化酶 (PC) 检测试剂盒说明书

分光光度法

*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

一、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，是糖异生过程的一个限速酶，在保证血糖的动态平衡方面起着重要的作用。

二、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。

三、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。

四、试剂的组成和配置：

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
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 × 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	

五、操作步骤：

● 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 4℃保存一周；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 4℃保存一周；
- 3、 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 $A=A_1-A_2$ 。

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。

六、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。

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

(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。

$$PC (U/g \text{ 鲜重}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1608 \times \Delta A \div W$$

(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。

$$PC (U/10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 3.215 \times \Delta A$$

$V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, $1 \times 10^{-3} \text{ L}$; ϵ : NADH 摩尔消光系数, $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$;

d : 比色皿光径, 1cm; $V_{\text{样}}$: 加入样本体积, 0.05 mL; $V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积, 1mL; T :

反应时间, 2min; 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。