

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 18 mL×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 10 μL 样本、10 μL 试剂四和 180 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 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。

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

(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, 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; 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。

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。

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

(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。

$$PC (\text{nmol/min/g 鲜重}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 3216 \times \Delta A \div W$$

(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; 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。