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

（货号：G0873F 分光法 48 样）

一、产品简介：

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、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 活性大小。

二、试剂盒的组成和配制：

试剂名称	规格	保存要求	备注
试剂一	液体 60mL×1 瓶	-20℃保存	
试剂二	液体 15mL×1 瓶	-20℃保存	
试剂三	液体 0.5mL×1 支	-20℃保存	
试剂四	粉剂 mg×1 支	-20℃保存	用前甩几下或离心使试剂落入底部，再加 1.1mL 蒸馏水溶解，用不完的试剂-20℃保存。
试剂五	粉剂 mg×1 支	-20℃保存	用前甩几下或离心使试剂落入底部，再加 1.1mL 蒸馏水溶解，用不完的试剂-20℃保存。
试剂六	粉剂 mg×2 支	-20℃保存	用前甩几下或离心使试剂落入底部，再加 0.55mL 蒸馏水溶解，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 30mL×1 瓶	4℃保存	
试剂八	粉剂 mg×1 支	-20℃保存	用前甩几下或离心使试剂落入底部，再加 1.1mL 蒸馏水溶解备用。

三、所需的仪器和用品：

紫外分光光度计、1mL 石英比色皿（光径 1cm）、台式离心机、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

四、丙酮酸羧化酶（PC)活性测定：

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 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。

② 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丙酮酸羧化酶（此步可选做），沉淀为线粒体。

③ 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（10^4）：提取液（mL）为 500~1000：1 的比例进行提取。

2、上机检测：

① 紫外分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 340nm，蒸馏水调零。

② 所有试剂解冻至室温（25℃）。

③ 在 1mL 石英比色皿中依次加入：

试剂名称（μL）	测定管
样本	40
试剂四	20
试剂五	20
试剂六	20
试剂七	600
试剂八	20
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，ΔA=A1-A2。	

【注】1.若△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ΔA 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（nmol/min/mg prot）＝$[\Delta A\div(\varepsilon\times d)\times 10^9\times V2]\div(V1\times Cpr)\div T$

$=1447\times\Delta A\div Cpr$

2、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（nmol/min/g 鲜重）＝$[\Delta A\div(\varepsilon\times d)\times 10^9\times V2]\div(W\times V1\div V)\div T$

$=292.3\times\Delta A\div W$

3、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（nmol/min/10^4 cell）$=[\Delta A\times V2\div(\varepsilon\times d)\times 10^9]\div(500\times V1\div V)\div T=0.585\times\Delta A$

V1---加入样本体积，0.04 mL；　V---加入提取液体积，0.202 mL；

V2---反应体系总体积，7.2×10^{-4} L；　d---光径，1cm；

T---反应时间，2min；　W---样本质量，g；

ε---NADH 摩尔消光系数，6.22×10^3 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。