



## 丙酮酸羧化酶活性检测试剂盒

### PC Assay Kit

微量法

产品编号: AK481M

产品规格: 100T/96S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
ES481	100mL×1 瓶	4℃保存;
AK481-A	18 mL×1 瓶	4℃保存;
AK481-B	13uL×1 支	4℃保存;
AK481-C	粉剂×1 支	-20℃保存;
AK481-D	粉剂×1 支	-20℃保存;

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介:

**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、CO<sub>2</sub> 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。

**原理:** 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。

自备用品:

紫外分光光度计/酶标仪、台式离心机、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔板 (UV 板)、研钵、冰和蒸馏水。

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 ES481, 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 ES481, 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/酶标仪预热 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 AK481-B 和 AK481-C 转移到 AK481-A 中混合溶解待用。
3. 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。
4. AK481-D 的配制: 在试剂 D 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。
5. 测定操作表 (微量石英比色皿或 96 孔板中加入下列试剂):

试剂名称	测定管 (ul)
样本	10
AK481-D	10
工作液	180
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  $\Delta A$  大于 0.5, 需将样本用提取液稀释适当倍数后测定, 使  $\Delta A$  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。

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

(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。

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

(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。

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

**注：** V 反总：反应体系总体积， $2 \times 10^{-4}$  L； $\epsilon$ ：NADH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3$  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。

※ 蛋白定量检测建议使用本公司：BCA Protein Assay Kit ([C05-02001](#))

##### 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。

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

(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。

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

(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。

$$PC (U/10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \times V \text{ 反总} - (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 6.43 \times \Delta A$$

**注：** V 反总：反应体系总体积， $2 \times 10^{-4}$  L； $\epsilon$ ：NADH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3$  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。

※ 蛋白定量检测建议使用本公司：BCA Protein Assay Kit ([C05-02001](#))