

丙酮酸羧化酶（PC）活性检测试剂盒说明书

紫外分光光度法

注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。

货号：BC0730

规格：50T/48S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 110 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 30 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	液体 10 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂三	粉剂×1 瓶	-20℃保存
试剂四	粉剂×1 瓶	-20℃保存
试剂五	液体 5 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂六	粉剂×1 支	-20℃保存
试剂六稀释液	液体 10 mL×1 瓶	2-8℃保存

溶液的配制：

- 1、试剂三：临用前加入 5 mL 蒸馏水溶解；可分装后-20℃保存 2 周，避免反复冻融；
- 2、试剂四：临用前加入 5 mL 蒸馏水溶解；可分装后-20℃保存 2 周，避免反复冻融；
- 3、试剂六：临用前加入 0.2mL 试剂六稀释液溶解，可分装后-20℃保存 4 周，避免反复冻融；
- 4、试剂六工作液：临用前根据样本量按试剂六：试剂六稀释液=0.05mL：1.5mL（共 1.55mL，约 15T）的比例进行配制，现用现配，当天用完；
- 5、工作液的配制：按照试剂二：试剂三：试剂四=2:1:1 的体积比例充分混匀，现用现配。

产品说明：

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，但在植物体和大部分细菌中却不含此酶。是供给草酰乙酸的主要补充反应，是糖异生过程的第一个限速酶。

PC不可逆的催化丙酮酸、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。

注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。

需自备的仪器和用品：

紫外分光光度计、低温离心机、水浴锅、1mL石英比色皿、可调式移液枪、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水。

操作步骤：

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

- 1、称取约 0.1g 组织或收集 500 万细胞，加入 1mL 提取液，用冰浴匀浆器或研钵匀浆。
- 2、4℃1000g 离心 10min。将上清液移至另一离心管中，4℃11000g 离心 15min。





- 3、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，可以判断线粒体提取效果）。
- 4、在沉淀中加入 1mL 提取液，超声波破碎（功率 200W，超声 5 秒，间隔 10 秒，重复 12 次），用于 PC 活性测定，并且用于蛋白含量测定。

二、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、试剂一用前 37°C 孵育 15min。
- 3、操作表：在 1mL 石英比色皿中分别加入下列试剂：

试剂名称 (μL)	空白管	测定管
试剂一	450	450
工作液	320	320
试剂五	80	80
试剂六工作液	100	100
样本	-	50
蒸馏水	50	-

在 1mL 石英比色皿中分别加入上述试剂，充分混匀后于 340nm 处测定 10s 时的吸光值 A1，迅速置于 37°C（哺乳动物）水浴 2min，拿出迅速擦干测定 130s 时的吸光值 A2，计算 ΔA 测定管=A1 测定-A2 测定， ΔA 空白管=A1 空白-A2 空白， $\Delta A=\Delta A$ 测定管- ΔA 空白管。（空白管只需做 1-2 次）

三、PC 活性计算

单位的定义：每毫克蛋白每分钟消耗 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$PC \text{ 酶活 (U/mg prot)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V \text{ 反总} \div (V \text{ 样} \times Cpr) \div T = 1607 \times \Delta A \div Cpr$$

ϵ : NADH 摩尔消光系数, $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$; d : 1mL 石英比色皿光径, 1cm; V 反总: 反应体系总体积, $1 \times 10^{-3} \text{ L}$; V 样: 反应体系中样本体积, 0.05mL; Cpr : 样本蛋白浓度, mg/mL; T : 反应时间: 2min; 10^9 : 单位换算系数, $1 \text{ mol} = 10^9 \text{ nmol}$ 。

注意事项:

- 1、为保证实验结果的准确性，需先取 1-2 个样做预实验， ΔA 大于 0.8 时，建议将粗酶液用提取液稀释后再进行测定。当 ΔA 小于 0.01 时，可以延长反应时间（5min 或 10min）来测定。
- 2、空白管为检测各试剂组分质量的检测孔，正常情况下，变化不超过 0.05。
- 3、样本的蛋白浓度需自行测定，由于提取液中含有较高的蛋白浓度（约 1mg/mL），所以测定样本蛋白浓度时需扣除提取液自身蛋白浓度。
- 4、推荐使用样本蛋白浓度计算酶活，若用样本质量计算，则需加测胞浆提取物酶活，上清和沉淀酶活之和为总酶活。
- 5、本试剂盒试剂足够完成 50 管反应。
- 6、附:使用样本重量计算公式:（样本检测数为 50T/24S）

A、上清中 PC 活力的计算:

酶活定义：每克样本每分钟消耗 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$PC \text{ 酶活 (U/g 质量)} = \Delta A1 \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V \text{ 反总} \div (V \text{ 样} \times W \div V \text{ 样总}) \div T = 1607 \times \Delta A1 \div W$$

$\Delta A1$: 上清测定值; ϵ : NADH 摩尔消光系数, $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$; d : 1mL 石英比色皿光径, 1cm; V 反总: 反应体系总体积, $1 \times 10^{-3} \text{ L}$; V 样: 反应体系中样本体积, 0.05mL; V 提取: 加入的提取液体积, 1mL; T : 反应时间: 2min; W : 样本质量, g; 10^9 : 单位换算系数, $1 \text{ mol} = 10^9 \text{ nmol}$ 。



B、沉淀中 PC 活力的计算:

酶活定义: 每克样本每分钟消耗 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

PC 酶活 (U/g 质量) = $\Delta A2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times W \div V_{\text{样总}}) \div T = 1607 \times \Delta A2 \div W$

$\Delta A2$: 上清测定值; ϵ : NADH 摩尔消光系数, 6.22×10^3 L/mol/cm; d : 1mL 石英比色皿光径, 1cm; $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, 1×10^{-3} L; $V_{\text{样}}$: 反应体系中样本体积, 0.05mL; $V_{\text{提取}}$: 沉淀重悬体积, 1mL; T : 反应时间: 2min; W : 样本质量, g; 10^9 : 单位换算系数, $1\text{mol} = 10^9\text{nmol}$ 。

C、样本 PC 总活力的计算:

样本 PC 总活力即为上清中 PC 活力与沉淀中 PC 活力之和。

按样本质量计算: $\text{PC (U/g 质量)} = 1607 \times \Delta A1 \div W + 1607 \times \Delta A2 \div W$

实验实例:

- 1、取 0.1g 兔心组织加入 1mL 提取液进行匀浆研磨, 用提取液稀释上清 100 倍, 稀释沉淀 4 倍, 之后按照测定步骤操作, 测得计算上清中 ΔA 测定管 = $A1$ 测定 - $A2$ 测定 = $1.104 - 0.856 = 0.248$, ΔA 空白管 = $A1$ 空白 - $A2$ 空白 = $1.021 - 0.988 = 0.033$, $\Delta A1 = \Delta A$ 测定管 - ΔA 空白管 = $0.248 - 0.033 = 0.215$, 沉淀中的 ΔA 测定管 = $A1$ 测定 - $A2$ 测定 = $1.07 - 0.716 = 0.354$, ΔA 空白管 = $A1$ 空白 - $A2$ 空白 = $1.021 - 0.988 = 0.033$, $\Delta A2 = \Delta A$ 测定管 - ΔA 空白管 = $0.354 - 0.033 = 0.321$; 按样本质量计算酶活得:

上清: PC 的酶活 (U/g 质量) = $1607 \times \Delta A1 \div W \times 100$ (稀释倍数) = $1607 \times 0.215 \div 0.1 \times 100 = 345505$ U/g 质量

沉淀: PC 酶活 U/g 质量 = $1607 \times \Delta A2 \div W \times 4$ (稀释倍数) = $1607 \times 0.321 \div 0.1 \times 4 = 20633.88$ U/g 质量

样本 PC 总酶活 (U/g 质量) = $1607 \times \Delta A1 \div W \times 100$ (稀释倍数) + $1607 \times \Delta A2 \div W$
= $1607 \times 0.215 \div 0.1 \times 100 + 1607 \times 0.321 \div 0.1 \times 4 = 366138.88$ U/g 质量。

相关发表文献:

- [1] Zhang C, Nie X, Zhang H, Wu Y, He H, Yang C, Jiang W, Gu Y. Functional dissection and modulation of the BirA protein for improved autotrophic growth of gas-fermenting *Clostridium ljungdahlii*. Microb Biotechnol. 2021 Sep;14(5):2072-2089. doi: 10.1111/1751-7915.13884. Epub 2021 Jul 21. PMID: 34291572; PMCID: PMC8449670.
- [2] Li F, Liu H, Wu X, Song Z, Tang H, Gong M, Liu L, Li F. Tetrathiomolybdate Decreases the Expression of Alkaline Phosphatase in Dermal Papilla Cells by Increasing Mitochondrial ROS Production. Int J Mol Sci. 2023 Feb 4;24(4):3123. doi: 10.3390/ijms24043123. PMID: 36834536; PMCID: PMC9960908.
- [3] Wu N, Xing M, Chen Y, Zhang C, Li Y, Song P, Xu Q, Liu H, Huang H. Improving the productivity of malic acid by alleviating oxidative stress during *Aspergillus niger* fermentation. Biotechnol Biofuels Bioprod. 2022 Dec 29;15(1):151. doi: 10.1186/s13068-022-02250-7. PMID: 36581946; PMCID: PMC9801644.

相关系列产品:

- BC0920/BC0925 果糖-1,6-二磷酸酶 (FBP) 活性检测试剂盒
BC3320/BC3325 葡萄糖-6-磷酸酶 (G6P) 活性检测试剂盒
BC3310/BC3315 磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶 (PEPCK) 活性检测试剂盒

