

丙酮酸羧化酶（PC）检测试剂盒（微量法）

产品货号：BA1058

产品规格：100管/96样

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。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

产品内容：

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液110mL×2瓶	4℃
试剂一	液体15mL×1瓶	4℃
试剂二	液体5mL×1瓶	4℃
试剂三	粉剂×1瓶	-20℃
试剂四	粉剂×1瓶	-20℃
试剂五	液体2mL×1瓶	4℃
试剂六	液体5 μL×1支	4℃
试剂六稀释液	液体5mL×1支	4℃

溶液的配制：

1. 试剂三：临用前加入3mL蒸馏水溶解；可分装后-20℃保存，避免反复冻融；
2. 试剂四：临用前加入2mL蒸馏水溶解；可分装后-20℃保存，避免反复冻融；
3. 试剂六：液体置于试剂瓶内EP管中。临用前按试剂六：试剂六稀释液=1:428（V:V）的比例稀释试剂六备用，现用现配；
4. 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。

所需的仪器和用品：

紫外分光光度计/酶标仪、台式离心机、水浴锅、微量石英比色皿/96孔UV板、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）

取约0.1g组织或收集500万细胞，加入1.0mL提取液，用冰浴匀浆器或研钵匀浆。

4℃1000g离心10min。将上清液移至另一离心管中，4℃11000g离心15min。

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）。

在沉淀中加入1mL提取液，超声波破碎（功率20%，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



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

QQ：807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com

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. 试剂一用前37℃孵育15min。
3. 操作表：

试剂名称 (μL)	空白管	测定管
试剂一	90	90
工作液	64	64
试剂五	16	16
试剂六	20	20
样本		10
蒸馏水	10	

在微量石英比色皿/96孔UV板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℃水浴或培养箱2min（酶标仪有控温功能可将温度调至37℃），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，ΔA=ΔA测定管-ΔA空白管。（空白管只需做1-2次）

二、PC酶活计算

1. 按微量石英比色皿计算：

单位的定义：每毫克蛋白每分钟消耗1nmol的NADH定义为一个酶活力单位。

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

ε：NADH摩尔消光系数，6.22×10³L/mol/cm；d：比色皿光径，1cm；V反总：反应体系总体积，2×10⁻⁴L；V样：反应体系中样本体积，0.01mL；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；T：反应时间：2min。

2. 按96孔UV板计算：将上述计算公式中的d-1cm改为d-0.6cm进行计算即可。

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（96孔UV板测定时ΔA大于0.5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方为总酶活。
5. 本试剂盒试剂足够完成100管反应。
6. 附：使用样本重量计算公式：（样本检测数为100T/48S）。

（1）按微量石英比色皿计算：

A、上清中PC活力的计算：

酶活定义：每克样本每分钟消耗1nmol的NADH定义为一个酶活力单位。

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

ΔA1：上清测定值；ε：NADH摩尔消光系数，6.22×10³L/mol/cm；d：比色皿光径，1cm；V反总：反应体系总体积，2×10⁻⁴L；V样：反应体系中样本体积，0.01mL；V提取：加入的提取液体积，1mL；T：反应时间：2min；W：样本质量，g。

B、沉淀中PC活力的计算：

酶活定义：每克样本每分钟消耗1nmol的NADH定义为一个酶活力单位。

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



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

QQ：807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com

ΔA_2 : 上清测定值; ϵ : NADH摩尔消光系数, $6.22 \times 10^3 \text{L/mol/cm}$; d : 比色皿光径, 1cm; $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, $2 \times 10^{-4} \text{L}$; $V_{\text{样}}$: 反应体系中样本体积, 0.01mL; $V_{\text{提取}}$: 沉淀重悬体积, 1mL; T : 反应时间: 2min; W : 样本质量, g。

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:

$$\text{PC (U/g质量)} = 1607 \times \Delta A_1 \div W + 1607 \times \Delta A_2 \div W$$

(2) 按96孔UV板计算:

将上述计算公式中的 $d=1\text{cm}$ 改为 $d=0.6\text{cm}$ 进行计算即可。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

QQ: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com