

## 丙酮酸羧化酶（PC）检测试剂盒（紫外分光光度法）

产品货号：BA1057

产品规格：50管/48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、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。

**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×1瓶	4℃
试剂一	液体30mL×1瓶	4℃
试剂二	液体10mL×1瓶	4℃
试剂三	粉剂×1瓶	-20℃
试剂四	粉剂×1瓶	-20℃
试剂五	液体5mL×1瓶	4℃
试剂六	液体15 μL×1支	4℃
试剂六稀释液	液体10mL×1支	4℃

### 溶液的配制：

1. 试剂三：临用前加入5mL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5mL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=1.6:660（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、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

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℃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）	测定管	空白管
试剂一	450	450
工作液	320	320



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

Q Q: 807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com

试剂五	80	80
试剂六	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℃（哺乳动物）水2min，拿出迅速擦干测定130s时的吸光值A2，计算 $\Delta A_{\text{测定管}} = A1_{\text{测定}} - A2_{\text{测定}}$ ， $\Delta A_{\text{空白管}} = A1_{\text{空白}} - A2_{\text{空白}}$ ， $\Delta A = \Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}$ 。（空白管只需做1-2次）		

### 三、PDC活性计算

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。

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

$\epsilon$ : NADH摩尔消光系数,  $6.22 \times 10^3 \text{L/mol/cm}$ ;  $d$ : 比色皿光径,  $1\text{cm}$ ;  $V_{\text{反总}}$ : 反应体系总体积,  $1 \times 10^{-3}\text{L}$ ;  $V_{\text{样}}$ : 反应体系中样本体积,  $0.05\text{mL}$ ;  $C_{\text{pr}}$ : 样本蛋白浓度,  $\text{mg/mL}$ ;  $T$ : 反应时间:  $2\text{min}$ ;  $10^9$ : 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， $\Delta A$ 大于0.8时，建议将粗酶液用提取液稀释后再进行测定。当 $\Delta A$ 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。

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

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

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

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

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



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

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com