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、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×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15μL×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

扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司
Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd
地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号
电话：400-611-0007 13671551480
Q Q：807961520
邮箱：saintbio@126.com
http://www.saint-bio.com

工作液	320	320
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）		

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。

PC酶活（U/mg prot）= ΔA÷（ε×d）×10^9×V反总÷（V样×Cpr）÷T=1607×ΔA÷Cpr

ε：NADH摩尔消光系数，6.22×10^3L/mol/cm；d：比色皿光径，1cm；V反总：反应体系总体积，1×10^{-3}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，1mol=10^9nmol。

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。

PC酶活（U/g质量）=ΔA1÷（ε×d）×10^9×V反总÷（V样×W÷V样总）÷T= 1607×ΔA1÷W

ΔA1：上清测定值；ε：NADH 摩尔消光系数，6.22×10^3L/mol/cm；d：比色皿光径，1cm；V反总：反应体系总体积，1×10^{-3}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，1mol=10^9nmol。

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。

PC酶活（U/g质量）=ΔA2÷（ε×d）×10^9×V反总÷（V样×W÷V样总）÷T = 1607×ΔA2÷W

ΔA2：上清测定值；ε：NADH摩尔消光系数，6.22×10^3L/mol/cm；d：比色皿光径，1cm；V反总：反应体系总体积，1×10^{-3}L；V样：反应体系中样本体积，0.05mL；V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，1mol=10^9nmol。

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：PC（U/g质量）=1607×ΔA1÷W+1607×ΔA2÷W