

丙酮酸羧化酶（PC）检测试剂盒（NADH 速率法/微量法）

货号：PMK1236

保存：-20℃避光保存 12 个月

规格：48T/96T

适用样本：动物组织、细胞、真菌

产品简介

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。它是供给草酰乙酸的主要补充反应，催化丙酮酸、ATP、CO₂ 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。本试剂盒提供了一种简单的检测方法，用于检测生物样本中 PC 的活性。其原理是 PC 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。

产品内容

试剂盒组分	规格		储存条件
	48T	96T	
提取液	50mL	100mL	4℃ 保存
试剂一	9mL	18mL	4℃ 保存
试剂二	7 μ L	14 μ L	-20℃ 保存
试剂三	粉剂×1 支	粉剂×1 支	-20℃ 保存
试剂四	粉剂×1 支	粉剂×1 支	-20℃ 保存

自备耗材

酶标仪或紫外分光光度计（能测 340nm 处的吸光度）及水浴锅

96 孔 UV 板或微量石英比色皿、可调节式移液枪及枪头

低温离心机、制冰机

去离子水

匀浆器

试剂准备

注意：各组分（小管试剂）开盖前，请先低速离心。

提取液：即用型；4℃ 保存。

工作液：临用前将试剂二和试剂三转移到试剂一中混合溶解待用；用不完的试剂分装后-20℃ 保存，避免反复冻融。

试剂四：临用前在试剂四瓶中 48T 加入 0.5mL 去离子水，96T 加入 1mL 去离子水充分溶解待用；用不完的试剂分装后-20℃ 保存，避免反复冻融。

样本制备

组织、真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 万真菌或细胞，加入 1mL 提取液，冰浴匀浆。
2. 将匀浆液 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提取液，超声波破碎5min（功率20%或200W，超声3s，间隔7s，重复30次），用于线粒体PC活性测定。

注意：1. 推荐使用新鲜样本，如果不立即进行实验，样本可在-80℃保存1个月。如需测定蛋白浓度，推荐使用Bradford法蛋白质定量试剂盒进行样本蛋白质浓度测定。

2. 对于脂肪含量较高的动物组织，离心后移除上层脂肪，再取上清液。

实验步骤

1. 酶标仪或紫外分光光度计预热30min以上，调节波长至340nm，紫外分光光度计去离子水调零。

2. 工作液置于25℃（一般物种）或者37℃（哺乳动物）孵育10min。

3. 样本测定：在96孔UV微孔板或微量石英比色皿中加入10μL样本、10μL试剂四和180μL工作液，立即混匀。记录340nm处初始吸光值 A_1 和2min后的吸光值 A_2 ，计算 $\Delta A=A_1-A_2$ 。

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 ΔA 小于0.001可适当加大样本量。如果 ΔA 大于0.5，样本可用提取液进一步稀释，计算结果乘以稀释倍数。

结果计算

A. 使用96孔板测定的计算公式如下

1. 按样本鲜重计算

单位定义：每g组织在反应体系中每分钟消耗1nmol NADH定义为一个酶活力单位。

上清中PC活力计算：

上清中PC活力(U/g 鲜重) = $[\Delta A_1 \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{提取}} \times W) \div T = 3215 \times \Delta A_1 \div W$

沉淀中PC活力计算：

沉淀中PC活力(U/g 鲜重) = $[\Delta A_2 \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{重悬}} \times W) \div T = 3215 \times \Delta A_2 \div W$

样本中PC总活力的计算：

PC总活力即为上清中PC活力与沉淀中PC活力之和。

PC总活力(U/g 鲜重) = $3215 \times \Delta A_1 \div W + 3215 \times \Delta A_2 \div W = 3215 \times (\Delta A_1 + \Delta A_2) \div W$

2. 按样本蛋白浓度计算

单位定义：每mg组织蛋白在反应体系每分钟消耗1nmol NADH定义为一个酶活力单位。

上清中PC活力计算：

上清中PC活力(U/mg prot) = $[\Delta A_1 \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T = 3215 \times \Delta A_1 \div C_{\text{pr}}$

沉淀中PC活力计算：

沉淀中PC活力(U/mg prot) = $[\Delta A_2 \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T = 3215 \times \Delta A_2 \div C_{\text{pr}}$

样本中PC总活力的计算：

PC总活力即为上清中PC活力与沉淀中PC活力之和。

PC总活力(U/mg prot) = $3215 \times \Delta A_1 \div C_{\text{pr}} + 3215 \times \Delta A_2 \div C_{\text{pr}} = 3215 \times (\Delta A_1 + \Delta A_2) \div C_{\text{pr}}$

3. 按真菌或细胞数量计算：

单位定义：每1万个细菌或细胞每分钟消耗1nmol NADH定义为一个酶活力单位。

上清中PC活力计算：

上清中PC活力(U/ 10^4 Cells) = $[\Delta A_1 \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{提取}} \times 500) \div T = 6.43 \times \Delta A_1$

沉淀中PC活力计算：

沉淀中PC活力(U/ 10^4 Cells) = $[\Delta A_2 \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{重悬}} \times 500) \div T = 6.43 \times \Delta A_2$

样本中PC总活力的计算：

PC总活力即为上清中PC活力与沉淀中PC活力之和。

PC总活力(U/ 10^4 Cells) = $6.43 \times \Delta A_1 + 6.43 \times \Delta A_2 = 6.43 \times (\Delta A_1 + \Delta A_2)$

ΔA_1 ：上清测定值； ΔA_2 ：沉淀测定值； $V_{\text{提取}}$ ：提取体系体积，1mL； $V_{\text{重悬}}$ ：重悬沉淀体积，1mL； $V_{\text{反应}}$ ：反应体系总体积， 2×10^{-4} L； ϵ ：NADH摩尔消光系数， 6.22×10^3 L/mol/cm； d ：96孔板光径，0.5cm； 10^9 ：1 mol = 1×10^9 nmol； $V_{\text{样}}$ ：加入样本体积，0.01mL； $V_{\text{样总}}$ ：加入提取液体积，1mL； T ：反应时间，2min； C_{pr} ：样本蛋白质浓度，mg/mL； W ：样品质量，g；500：真菌或细胞总数， 5×10^6 。

B. 使用微量石英比色皿测定的计算公式

将上述计算公式中光径 d ：0.5cm调整为 d ：1cm进行计算即可。

产品说明书

注意事项

1. 实验过程中请穿戴实验服、口罩和乳胶手套。请按照生物实验室的国家安全规定进行实验，尤其是在检测血样或其他体液时。
2. 本试剂盒仅用于实验室科学研究，如果本试剂盒用于临床诊断或任何其他用途，我们将不对任何后果负责。
3. 本试剂盒应在有效期内使用，并请严格按照说明书进行存储。
4. 不同批次号、不同厂家之间的组分不要混用；否则，可能导致结果异常。
5. 勤换吸头，避免各组分之间的交叉污染。

相关产品：

PMK1116 丙酮酸（PA）检测试剂盒（微量法）

PMK1006 丙酮酸脱羧酶（PDC）检测试剂盒（微量法）

PMK1121 丙酮酸激酶（PK）检测试剂盒（微量法）

PMK1123 磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶（PEPC）检测试剂盒（微量法）

更多产品详情了解，请关注公众号：

