

丙酮酸羧化酶（PC）检测试剂盒（微量法）

货号：PMK1885

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,通过测定Pi增加速率来反映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 | 粉剂×1支 | 粉剂×1支 | -20℃保存 |
| 试剂三 | 粉剂×1支 | 粉剂×1支 | 4℃保存 |
| 试剂四 | 粉剂×1支 | 粉剂×1支 | 4℃保存 |
| 试剂五 | 粉剂×1支 | 粉剂×1支 | 4℃保存 |
| 试剂六 | 5mL | 10mL | 室温保存 |
| 标准品 | 1mL | 1mL | 4℃保存 |

自备耗材

酶标仪或分光光度计（能测 660nm 处的吸光度）及水浴锅

96 孔板或微量玻璃比色皿、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：小管试剂开盖前，请先低速离心。

提取液：即用型；4℃保存。

试剂一：即用型；使用前，平衡到室温；4℃保存。

试剂二：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。

试剂三：临用前配制，48T 加入 2mL 去离子水充分溶解，96T 加入 4mL 去离子水充分溶解后使用。

试剂四：临用前配制，48 T 加入 5mL 去离子水充分溶解，96T 加入 10mL 去离子水充分溶解后使用。

试剂五：临用前配制，48 T 加入 5mL 去离子水充分溶解，96 T 加入 10mL 去离子水充分溶解后使用。

试剂六：即用型；室温保存。

产品说明书

定磷试剂的配制：配制比例按照 H₂O : 试剂四 : 试剂五 : 试剂六=2:1:1:1 的比例配制，配好的定磷试剂应为浅黄色。若无色则试剂失效，若是蓝色则为磷污染（请根据需要，用多少配多少）。

注意：配试剂最好用新的玻璃器皿或者一次性塑料器皿，以避免磷污染。

标准曲线设置：按下表所示用去离子水将 10mM 标准品稀释为 1、0.5、0.25、0.125、0.0625、0.0313、0.0156 mM 的标准溶液。

| | 标准品体积 (μL) | 去离子水体积 (μL) | 标准品浓度 (mM) |
|--------|----------------------------|-------------|------------|
| Std. 1 | 100μL 10mM | 900 | 1 |
| Std. 2 | 100μL of Std. 1 (1mM) | 100 | 0.5 |
| Std. 3 | 100μL of Std. 2 (0.5mM) | 100 | 0.25 |
| Std. 4 | 100μL of Std. 3 (0.25mM) | 100 | 0.125 |
| Std. 5 | 100μL of Std. 4 (0.125mM) | 100 | 0.0625 |
| Std. 6 | 100μL of Std. 5 (0.0625mM) | 100 | 0.0313 |
| Std. 7 | 100μL of Std. 6 (0.0313mM) | 100 | 0.0156 |

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. 酶标仪或可见分光光度计预热 30min 以上，调节波长到 660nm，可见分光光度计去离子水调零。
2. 酶促反应（在 EP 管中依次加入下列试剂）：

| | 空白管 (μL) | 标准管 (μL) | 测定管 (μL) | 对照管 (μL) |
|-----|----------|----------|----------|----------|
| 试剂一 | 0 | 0 | 180 | 180 |
| 试剂二 | 0 | 0 | 10 | 10 |
| 样本 | 0 | 0 | 10 | 0 |

混匀后盖紧，37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）准确孵育 30min

| | | | | |
|-----|---|---|----|----|
| 试剂三 | 0 | 0 | 20 | 20 |
| 样本 | 0 | 0 | 0 | 10 |

混匀后，室温（25℃左右），4,000g，离心 10min，取上清液；

3. 定磷（在 96 孔板或微量玻璃比色皿中加入下列试剂）

| | | | | |
|----|---|---|----|----|
| 上清 | 0 | 0 | 40 | 40 |
|----|---|---|----|----|

产品说明书

| | | | | |
|---------|-----|-----|-----|-----|
| 不同浓度标准品 | 0 | 40 | 0 | 0 |
| 去离子水 | 40 | 0 | 0 | 0 |
| 定磷试剂 | 200 | 200 | 200 | 200 |

混匀，室温静置 10min 后，测定 660nm 吸光值。计算 $\Delta A_{\text{测}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ ， $\Delta A_{\text{标}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$ 。（空白管只需做 1 管）

4. 注意：为保证实验结果的准确性，需先取 1-2 个样做预实验，如果测定的吸光值过高（高于 1.5）可用试剂二稀释样本后再测定，计算结果时注意乘以稀释倍数。

结果计算

1. 标准曲线的绘制

以标准液浓度为 y 轴， $\Delta A_{\text{标}}$ 为 x 轴，绘制标准曲线（浓度为 y 轴更方便计算结果）。

2. 无机磷 (Pi) 含量的计算

将 $\Delta A_{\text{测}}$ 带入方程得到 y 值 (mM)。

3. PC 活性计算

(1) 按样本鲜重计算

单位的定义：每 g 组织在反应体系中每分钟产生 1nmol 无机磷定义为一个酶活性单位 U。

上清中 PC 活性的计算：

$$\text{PC 上清活性 (U/g 鲜重)} = (y_{\text{上清}} \times V_{\text{酶促}} \times 10^6) \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{提取}} \times W) \div T = 666.67 \times y_{\text{上清}} \div W$$

沉淀中 PC 活性的计算：

$$\text{PC 沉淀活性 (U/g 鲜重)} = (y_{\text{沉淀}} \times V_{\text{酶促}} \times 10^6) \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{重悬}} \times W) \div T = 666.67 \times y_{\text{沉淀}} \div W$$

样本 PC 总活性的计算：

样本 PC 总活性即为上清中 PC 活性与沉淀中 PC 活性之和。

$$\text{按样本鲜重计算：PC 总活性 (U/g 鲜重)} = 666.67 \times y_{\text{上清}} \div W + 666.67 \times y_{\text{沉淀}} \div W \\ = 666.67 \times (y_{\text{上清}} + y_{\text{沉淀}}) \div W$$

(2) 按细胞数量计算

单位的定义：每 1 万个细胞每分钟产生 1nmol 无机磷定义为一个酶活性单位 U。

上清中 PC 活性的计算：

$$\text{PC 上清活性 (U/10}^4 \text{ cell)} = (y_{\text{上清}} \times V_{\text{酶促}} \times 10^6) \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{提取}} \times 500) \div T = 1.33 \times y_{\text{上清}}$$

沉淀中 PC 活性的计算：

$$\text{PC 沉淀活性 (U/10}^4 \text{ cell)} = (y_{\text{沉淀}} \times V_{\text{酶促}} \times 10^6) \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{重悬}} \times 500) \div T = 1.33 \times y_{\text{沉淀}}$$

样本 PC 总活性的计算：

样本 PC 总活性即为上清中 PC 活性与沉淀中 PC 活性之和。

$$\text{按细胞数量计算：PC 总活性 (U/10}^4 \text{ cell)} = 1.33 \times y_{\text{上清}} + 1.33 \times y_{\text{沉淀}} = 1.33 \times (y_{\text{上清}} + y_{\text{沉淀}})$$

(3) 按样本蛋白浓度

单位的定义：每毫克组织蛋白在反应体系中每分钟产生 1nmol 无机磷定义为一个酶活性单位 U。

上清中 PC 活性的计算：

$$\text{PC 上清活性 (U/mg prot)} = (y_{\text{上清}} \times V_{\text{酶促}} \times 10^6) \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) \div T = 666.67 \times y_{\text{上清}} \div \text{Cpr}$$

沉淀中 PC 活性的计算：

$$\text{PC 沉淀活性 (U/mg prot)} = (y_{\text{沉淀}} \times V_{\text{酶促}} \times 10^6) \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) \div T = 666.67 \times y_{\text{沉淀}} \div \text{Cpr}$$

样本 PC 总活性的计算：

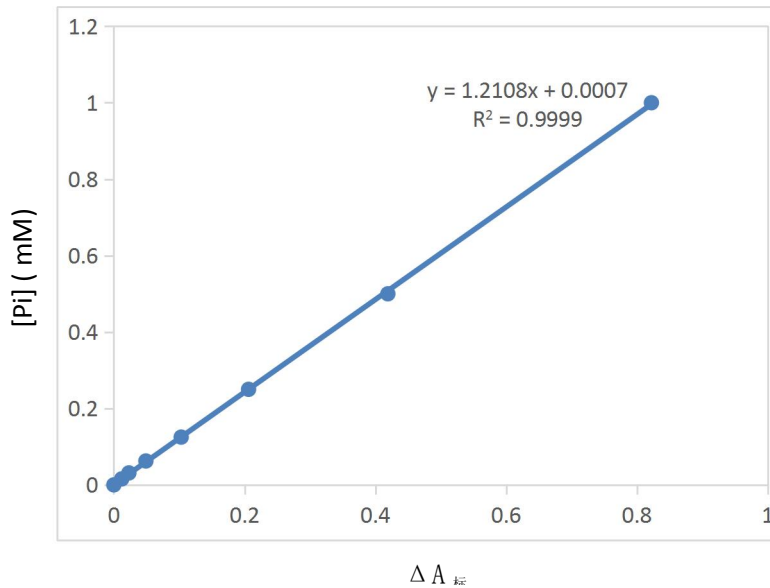
样本 PC 总活性即为上清中 PC 活性与沉淀中 PC 活性之和。

$$\text{按样本鲜重计算：PC 总活性 (U/g 鲜重)} = 666.67 \times y_{\text{上清}} \div \text{Cpr} + 666.67 \times y_{\text{沉淀}} \div \text{Cpr} \\ = 666.67 \times (y_{\text{上清}} + y_{\text{沉淀}}) \div \text{Cpr}$$

$V_{\text{酶促}}$ ：酶促反应体系总体积， 2×10^{-4} L； 10^6 ：单位换算系数， $1\text{mmol} = 10^6\text{nmol}$ ； $V_{\text{样}}$ ：加入样本体积，0.01mL；T：反应时间，30min； $V_{\text{提取}}$ ：提取体系体积，1mL；W：样本重量，g； $V_{\text{重悬}}$ ：重悬沉淀体积，1mL；500：细胞总数，500 万；Cpr：上清液蛋白质浓度，mg/mL。

结果展示

典型标准曲线-以下数据和曲线仅供参考，实验者需根据自己的实验建立标准曲线。



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：

