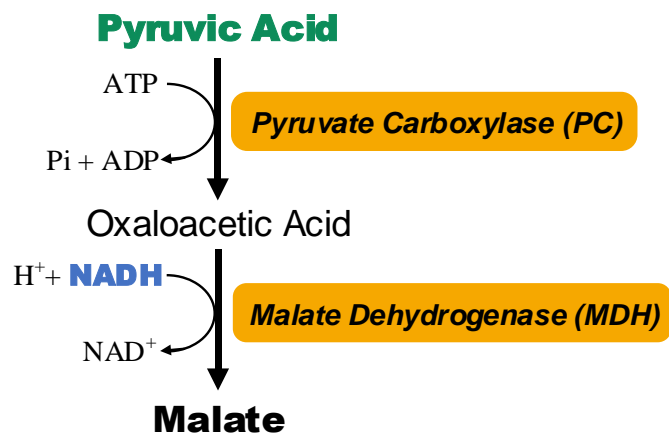




丙酮酸羧化酶 (PC) 活性检测试剂盒
Pyruvate Carboxylase (PC) Activity Assay Kit



北京盒子生工科技有限公司
Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.



丙酮酸羧化酶 (PC) 活性检测试剂盒

Pyruvate Carboxylase (PC) Activity Assay Kit

一、产品描述

丙酮酸羧化酶是糖异生途径的关键酶，广泛存在于动物、霉菌和酵母中，作为糖异生途径的第一个限速酶，可催化丙酮酸转化为草酰乙酸，进而将碳流引入目标羧酸的合成途径，在机体糖代谢水平分析、维持血糖动态平衡和临床诊断方面具有重要作用。

丙酮酸羧化酶可催化丙酮酸生成草酰乙酸，苹果酸脱氢酶进一步催化草酰乙酸和 NADH 生成苹果酸和 NAD⁺，NADH 在 340 nm 处具有特征吸收峰，通过吸光值变化即可表征丙酮酸羧化酶的活性。

二、产品内容

名称	试剂规格	储存条件	使用说明及注意事项
提取液	液体 110 mL×2 瓶	4°C 保存	-
试剂一	液体 15 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂二	液体 5 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂三	粉剂×1 瓶	-20°C 保存	使用前加入 3 mL 蒸馏水充分溶解 (分装后-20°C 保存, 避免反复冻融)
试剂四	粉剂×1 瓶	-20°C 保存	使用前加入 2 mL 蒸馏水充分溶解 (分装后-20°C 保存, 避免反复冻融)
试剂五	液体 2 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂六	组分 A	液体 5 μL×1 支	使用前按组分 A:组分 B=1:428 的体积比配制 (根据使用量现用现配)
	组分 B	液体 5 mL×1 瓶	

三、产品使用说明

测定过程中所需要的仪器和试剂：紫外分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿（光径 10 mm）/96 孔 UV 板、研钵/匀浆器、可调式移液器/多道移液器、台式离心机、恒温水浴/培养箱和蒸馏水。

1. 粗酶液的制备（可根据预实验结果适当调整样本量和比例）

①称取 100 mg 组织或收集 500 万细菌或细胞，加入 1 mL 提取液，使用匀浆器或研钵冰浴研磨至匀浆，匀浆液 4°C 1000 g 离心 10 min，弃沉淀，留上清；

②将匀浆液离心上清液移至另一离心管中，4°C 11000 g 离心 15 min；

③步骤②离心后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）。

④步骤②离心后沉淀中加入 1 mL 提取液，冰浴超声破碎（功率 20%或 200 W，超声 5 s，间隔 10 s，重复 15 次），4°C 11000 g 离心 10 min，取上清用于 PC 活性测定。

2.测定步骤

- ①紫外分光光度计/酶标仪预热 30 min 以上，调节波长至 340 nm，蒸馏水调零。
- ②试验前将试剂一 37°C 预热 15 min。
- ③PC 工作液的配制（现用现配）：按照试剂二：试剂三：试剂四=2:1:1 的体积比配制。
- ④在 96 孔 UV 板或微量石英比色皿中依次加入下列试剂：

试剂	测定组 (μL)	空白组 (μL)
试剂一	90	90
PC 工作液	64	64
试剂五	16	16
试剂六	20	20
粗酶液	10	-
蒸馏水	-	10

吸光值测定：①充分混匀并立即开始计时，测定 10 s 时（总时间）340 nm 处吸光值，记为 A1 测定和 A1 空白；②37°C 准确反应 120 s，测定 130 s（总时间）时 340 nm 处吸光值，记为 A2 测定和 A2 空白；③计算 ΔA 测定=A1 测定-A2 测定， ΔA 空白=A1 空白-A2 空白， $\Delta A = \Delta A$ 测定- ΔA 空白。注：空白组只需测定 1-2 次。

3.丙酮酸羧化酶（PC）活性计算

3.1 使用微量石英比色皿测定的计算公式

单位定义：每 mg 蛋白每分钟消耗 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{PC (U/mg prot)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times 10^9}{\epsilon \times d_1 \times \text{Cpr} \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{1607.7 \times \Delta A}{\text{Cpr}}$$

3.2 使用 96 孔 UV 板测定的计算公式

单位定义：每 mg 蛋白每分钟消耗 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{PC (U/mg prot)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times 10^9}{\epsilon \times d_2 \times \text{Cpr} \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{3215.4 \times \Delta A}{\text{Cpr}}$$

注释： V 样：反应体系中加入粗酶液的体积，0.01 mL；V 反总：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_1 ：微量比色皿光径，1 cm； d_2 ：96 孔 UV 板光径，0.5 cm；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；T：反应时间：120 s=2 min； 10^9 ：单位换算系数，1 mol= 10^9 nmol。

四、注意事项

①若 ΔA 大于 0.8 (96 孔 UV 板大于 0.4), 建议将粗酶液使用提取液适当稀释后再进行测定; 若 ΔA 小于 0.01, 可适当延长反应时间或增加样本量后再进行测定, 计算时相应修改;

②若使用 96 孔 UV 板进行测定, 需使用多道移液器且分批进行测定, 以确保组间反应时间一致;

③提取液中含有约 1 mg/mL 蛋白, 测定样本蛋白浓度时需扣除提取液自身的蛋白浓度;

④为保证结果准确且避免试剂损失, 测定前请仔细阅读说明书 (以实际收到说明书内容为准), 确认试剂储存和准备是否充分, 操作步骤是否清楚, 且务必取 2-3 个预期差异较大的样本进行预测定, 过程中问题请您及时与工作人员联系;

⑤推荐使用样本蛋白浓度计算酶活, 若使用样本质量计算, 则需加测胞浆提取物酶活, 上清和沉淀酶活之和即为总酶活。

附: 使用样本质量计算的公式

(1) 使用微量石英比色皿测定的计算公式

单位定义: 每 g 样本每分钟消耗 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{上清中 PC (U/g)} = \frac{\Delta A_1 \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{提}_1} \times 10^9}{\epsilon \times d_1 \times W \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{1607.7 \times \Delta A_1}{W}$$

$$\text{沉淀中 PC (U/g)} = \frac{\Delta A_2 \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{提}_2} \times 10^9}{\epsilon \times d_1 \times W \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{1607.7 \times \Delta A_2}{W}$$

$$\text{PC (U/g)} = \text{上清中 PC} + \text{沉淀中 PC} = \frac{1607.7 \times \Delta A_1}{W} + \frac{1607.7 \times \Delta A_2}{W}$$

(2) 使用 96 孔 UV 板测定的计算公式

单位定义: 每 g 样本每分钟消耗 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{上清中 PC (U/g)} = \frac{\Delta A_1 \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{提}_1} \times 10^9}{\epsilon \times d_2 \times W \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{3215.4 \times \Delta A_1}{W}$$

$$\text{沉淀中 PC (U/g)} = \frac{\Delta A_2 \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{提}_2} \times 10^9}{\epsilon \times d_2 \times W \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{3215.4 \times \Delta A_2}{W}$$

$$\text{PC (U/g)} = \text{上清中 PC} + \text{沉淀中 PC} = \frac{3215.4 \times \Delta A_1}{W} + \frac{3215.4 \times \Delta A_2}{W}$$

注释: ΔA_1 : 上清粗酶液测定值; ΔA_2 : 沉淀粗酶液测定值; $V_{\text{样}}$: 反应体系中加入粗酶液的体积, 0.01 mL; $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, 2×10^{-4} L; $V_{\text{提}_1}$: 上清粗酶液总体积, 1 mL; $V_{\text{提}_2}$: 沉淀重悬体积, 1 mL; ϵ : NADH 摩尔消光系数, 6.22×10^3 L/mol/cm; d_1 : 微量石英比色皿光径, 1 cm; d_2 : 96 孔 UV 板光径, 0.5 cm; W : 样本质量, g; T : 反应时间: 120 s=2 min; 10^9 : 单位换算系数, 1 mol= 10^9 nmol。

For Research Use Only. Not for Use in Diagnostic Procedures.

