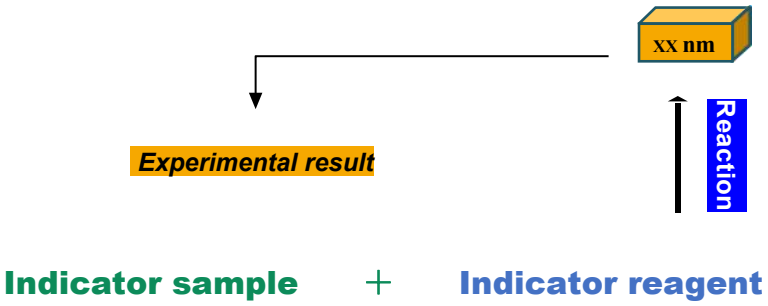
上海茁彩生物科技有限公司

Shanghai zcibio technology Co.,Ltd.



生化检测原理示意图

货号：ZC-S0815　　规格：50管/48样

丙酮酸羧化酶（PC)试剂盒说明书
分光光度法

正式测定前务必取2-3个预期差异较大的样本做预测定

产品内容：

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液	100mL×1 瓶	4℃保存	–
试剂一	液体47 mL×1 瓶	4℃保存	–
试剂二	液体×1 支	4℃保存	–
试剂三	粉剂×1 支	-20℃保存	–
试剂四	粉剂×1 支	-20℃保存	–

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，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。

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。

需自备的仪器和用品：

分光光度计、台式离心机、可调式移液器、1 mL石英比色皿、研钵、冰和蒸馏水。

操作步骤：

一、 样本的前处理

组织、细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500万细菌或细胞，加入1mL提取液，用冰浴匀浆器或研钵匀浆。

2、 将匀浆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（冰浴，功率20%或200W，超声3秒，间隔10秒，重复30次），用于线粒体PC活性测定。

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、 工作液的配制：临用前将试剂二和试剂三转移到试剂一中混合溶解待用；置于37℃(哺乳动物)或25℃(其它物种)预热5分钟；用不完的试剂4℃保存一周；

试剂四的配制：在试剂四瓶中加入2.5mL 蒸馏水充分溶解待用；用不完的试剂4℃保存一周；

3、 在1mL石英比色皿中加入50μL样本、50μL试剂四和900μL工作液，立即混匀，记录340nm处初始吸光值A1和2min后的吸光值A2，计算A=A1-A2。

注意：在该试剂盒中，若ΔA大于0.5，需将样本用提取液稀释适当倍数后测定，使ΔA小于0.5 可提高检测灵敏度。计算公式中乘以相应稀释倍数。

PC 活性计算：

（1） 按样本蛋白浓度计算

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

PC（U/mg prot）＝[ΔA×V 反总÷（ε×d）×10^9]÷(V 样×Cpr) ÷T=1608×ΔA÷Cpr

（2） 按样本鲜重计算

单位定义：每g组织每分钟消耗1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

PC（U/g 鲜重）＝[ΔA×V 反总÷（ε×d）×10^9]÷(W ×V 样÷V 样总)÷T=1608×ΔA÷W

（3） 按细菌或细胞密度计算：

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

PC（U/10^4 cell）＝[ΔA×V 反总÷（ε×d）×10^9]÷(500×V 样÷V 样总)÷T=3.215×ΔA

V 反总：反应体系总体积，1×10^{-3} L；ε：NADH 摩尔消光系数，6.22×10^3 L / mol /cm；d：比色皿光径，1cm；V 样：加入样本体积，0.05 mL；V 样总：加入提取液体积，1 mL；T：反应时间，2 min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；500：细菌或细胞总数，500 万。