



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 400-666-5481 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: 3008007435@qq.com

丙酮酸羧化酶 (PC) 试剂盒

可见分光光度法

货号: R45037-48S

产品简介:

丙酮酸羧化酶(PC,EC 6.4.1.1)广泛存在于动物、霉菌和酵母中,但在植物体和大部分细菌中却不含此酶,主要分布于线粒体中。丙酮酸羧化酶催化丙酮酸生成草酰乙酸,是TCA循环中草酰乙酸的回补关键酶,也是糖异生过程的第一个限速酶。

丙酮酸羧化酶 (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 活性大小。

试剂盒的组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
试剂一	液体60mL×1瓶	-20℃保存	
试剂二	液体15mL×1瓶	-20℃保存	
试剂三	液体0.5mL×1支	-20℃保存	
试剂四	粉剂mg×1支	-20℃保存	用前甩几下或离心使试剂落入底部, 再加1.1mL蒸馏水溶解, 用不完的试剂-20℃保存。
试剂五	粉剂mg×1支	-20℃保存	用前甩几下或离心使试剂落入底部, 再加1.1mL蒸馏水溶解, 用不完的试剂-20℃保存。
试剂六	粉剂mg×2支	-20℃保存	用前甩几下或离心使试剂落入底部, 再加0.55mL蒸馏水溶解, 用不完的试剂分装后-20℃保存, 禁止反复冻融, 三天内用完。
试剂七	液体30mL×1瓶	4℃保存	
试剂八	粉剂mg×1支	-20℃保存	用前甩几下或离心使试剂落入底部, 再加1.1mL蒸馏水溶解备用。



所需的仪器和用品:

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

丙酮酸羧化酶 (PC)活性测定:

1.线粒体制备(提示: 整个线粒体的提取过程须保持4℃低温环境):

①称取约0.1g 组织或收集500万细胞, 加入1mL 试剂一, 用冰浴匀浆器或研钵匀浆, 转移至离心管后于4℃×700g 离心10min。

②弃沉淀, 上清液移至另一离心管中, 4℃×12000g 离心10min。上清液即胞浆提取物, 可用于测定胞浆中的泄漏的丙酮酸羧化酶(此步可选做), 沉淀为线粒体。

③在沉淀(线粒体)中加入200 μL试剂二和2μL试剂三, 超声波破碎(冰浴, 功率20%或 200W, 超声3s, 间隔10秒, 重复30次), 液体置于冰上用于线粒体中丙酮酸羧化酶活性测定。

【注】:若增加样本量, 可按照组织质量 (g): 提取液体积(mL)为1:5~10的比例进行提取, 或按照细胞数量(10^4):提取液 (mL) 为500~1000:1的比例进行提取。

2、上机检测:

①紫外分光光度计预热30min 以上, 调节波长至340nm, 蒸馏水调零。

②所有试剂解冻至室温(25℃)。

③在1mL石英比色皿中依次加入:

试剂名称(μL)	测定管
样本	40
试剂四	20
试剂五	20
试剂六	20
试剂七	600
试剂八	20
轻轻混匀, 室温(25℃)条件下, 于340nm处读取吸光值A1, 2min后读取吸光值A2, $\Delta A = A1 - A2$ 。	



结果计算：

1、按样本蛋白浓度计算

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

$$\text{PC}(\text{nmol/min/mg prot}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_2] \div (V_1 \times \text{Cpr}) \div T$$
$$= 1447 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

2、按样本鲜重计算

酶活定义：每克组织每分钟消耗1nmol NADH定义为一个酶活力单位。

$$\text{PC}(\text{nmol/min/g 鲜重}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_2] \div (W \times V_1 \div V) \div T$$
$$= 292.3 \times \Delta A \div W$$

3、按细菌/细胞密度计算

酶活定义：每1万个细菌/细胞每分钟产生1nmol NADH为一个酶活单位。

$$\text{PC}(\text{nmol/min}/10^4\text{cell}) = [\Delta A \times V_2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_1 \div V) \div T$$
$$= 0.585 \times \Delta A$$

V1--- 加入样本体积，0.04mL;

V---加入提取液体积，0.202 mL;

V2--- 反应体系总体积，7.2×10⁻⁴ L;

d---光径，1cm;

T---反应时间， 2min;

W---样本质量， g;

ε---NADH 摩尔消光系数，6.22×10³ L/mol/cm;

Cpr---蛋白质浓度， mg/mL， 建议使用本公司的BCA 蛋白含量检测试剂盒。