（本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断！）

产品货号：E-BC-K608-M

产品规格：48T(46 samples)/96T(94 samples)

检测仪器：酶标仪(340 nm)

Elabscience®丙酮酸羧化酶(PC)比色法测试盒

Pyruvate Carboxylase (PC) Activity Assay Kit

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话：400-999-2100

邮箱：biochemical@elabscience.cn

网址：www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。

联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

用途

本试剂盒适用于检测血清（浆）、动物组织及细胞样本中的丙酮酸羧化酶(PC)的活力。

检测原理

丙酮酸羧化酶(Pyruvate Carboxylate，PC)是一种生物素依赖性酶，通过羧化作用将丙酮酸转化为草酰乙酸。PC 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。在三羧酸循环中，它是供给草酰乙酸的主要补充反应，也是糖异生过程的第一个限速酶。

PC 催化底物生成的产物在添加酶试剂的作用下产物消耗还原剂。还原剂在 340 nm 处有最大吸光度，通过反应消耗还原剂的量来计算 PC 的酶活。

本试剂盒检测组织和细胞样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用 BCA 法。(货号：E-BC-K318-M)。

提供试剂和物品

编号	名称	规格 1 (Size 1)(48 T)	规格 2 (Size 2)(96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	缓冲液 (Buffer Solution)	15 mL×1 瓶	30 mL×1 瓶	-20ºC 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	催化剂 (Catalyst)	粉剂×1 支	粉剂×2 支	-20ºC 避光保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	酶试剂 (Enzyme Reagent)	0.1 mL×1 支	0.2 mL×1 支	-20ºC 避光保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	促进剂 (Accelerant)	0.1 mL×1 支	0.2 mL×1 支	-20ºC 避光保存 6 个月
试剂五 (Reagent 5)	还原剂 (Reducing Reagent)	粉剂×1 支	粉剂×2 支	-20ºC 避光保存 6 个月
	96 孔紫外酶标板	96 孔×1 块		无要求
	96 孔覆膜	2 张		
	样本位置标记表	1 张		

说明：试剂严格按上表中的保存条件保存，不同测试盒中的试剂不能混用。对于体积较少的试剂，使用前请先离心，以免量取不到足够量的试剂。

所需自备物品

仪器：酶标仪(最佳检测波长 340 nm)、37°C 恒温箱

试剂：双蒸水，生理盐水(0.9 %NaCl)

试剂准备

① 检测前，试剂盒中的试剂平衡至室温。

② 试剂二工作液的配制：

取一支试剂二加入0.75 mL双蒸水，溶解混匀，未使用完的试剂可在-20°C避光保存12天。

③ 试剂五工作液的配制：

取一支试剂五加入0.5 mL双蒸水，溶解混匀，未使用完的试剂可在-20°C避光保存7天。

④ 测定工作液的配制：

将试剂一:试剂二工作液:试剂三:试剂四:试剂五工作液按体积比=181: 10: 1: 1: 7配制，置于冰上避光待用，现配现用，按需配制，一天内使用有效。

样本准备

① 样本处理

血清(浆)样本：直接测定

组织样本：按照组织样本质量(g)：生理盐水(0.9%NaCl)体积(mL) = 1: 9的比例匀浆(如0.05 g组织样本，加入450 μL生理盐水)。4°C，10000 × g离心10 min，取上清待测，留取部分上清进行蛋白浓度测定。

细胞样本：按照1×10^6个细胞：生理盐水(0.9%NaCl) =1: 200比例匀浆(如1×10^6个细胞，加入200 μL生理盐水)。4°C，10000 × g离心10 min，取上清待测，留取部分上清进行蛋白浓度测定。

② 样本的稀释

在正式检测前，需选择2-3个预期差异大的样本稀释成不同浓度进行预实验，根据预实验的结果，结合本试剂盒的线性范围：6.43-876.53 U/L，请参考下表稀释(仅供参考)：

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
10%小鼠肝组织	90-110	10%大鼠肝组织	90-110
10%小鼠肾组织	90-110	10%大鼠肾组织	90-110
10%小鼠心组织	90-110	10%大鼠心组织	90-110
10%小鼠肺组织	70-80	大鼠血浆	10-20
小鼠血浆	10-20	大鼠血清	10-20
小鼠血清	10-20	1.24×10^6 个 Molt-4 细胞	2-4
1.92×10^6 个 CHO 细胞	2-4	0.88×10^6 个 Hela 细胞	2-4
0.99×10^6 个 293T 细胞	2-4	1.36×10^6 个 Raw 细胞	2-4
1.44×10^6 个 4T1 细胞	2-4	1.24×10^6 个 HL-60 细胞	2-4
1.58×10^6 个 Jurkat 细胞	2-4		

注：稀释液为生理盐水(0.9 %NaCl)。

实验关键点

① 在样本测定时，测定孔 A_2 值应大于 0.2，若测定孔 A_2 小于 0.2 需要将样本稀释后再进行测定。

② 样本反应速率较快，如果没有即时测定 A_1，可能会导致样本测定值低或测不出值。

操作步骤

① 测定孔：取 10 μL 待测样本加入相应的酶标板孔中。
空白孔：取 10 μL 生理盐水加入相应的酶标孔中。

② 向步骤①中各孔加入 190 μL 测定工作液。

③ 振板 5 s，加入测定工作液后 15 s 立即在酶标仪 340 nm 波长下检测各孔 OD 值 A_1，37°C 孵育 5 min 后测定各孔 OD 值 A_2。样本反应速率较快，如果没有即时测定 A_1，可能会导致样本测定值低或测不出值。

操作表

	测定孔	**空白孔**
待测样本(μL)	10	--
生理盐水(μL)	--	10
测定工作液(μL)	190	190
振板 5 s，加入测定工作液后 15 s 立即在酶标仪 340 nm 波长下检测各孔 OD 值 A_1，37°C 孵育 5 min 后测定各孔 OD 值 A_2。样本反应速率较快，如果没有即时测定 A1，可能会导致样本测定值低或测不出值。		

本试剂盒检测组织和细胞样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用 BCA 法。(货号：E-BC-K318-M)。

结果计算

组织或细胞样本中丙酮酸羧化酶(PC)活力计算公式：

定义：25°C 条件下，每克组织或细胞蛋白每分钟催化底物产生 1 μmol 的产物所需要的酶量为一个活力单位。

$$\text{PC 活力 (U/gprot)} = \frac{\Delta A_{340} \times V_{总} \times f}{\varepsilon \times d \times V_{样} \times T \times C_{pr}}$$

血浆(清)样本中丙酮酸羧化酶(PC)活力计算公式：

定义：25°C 条件下，每升血浆(清)每分钟催化底物产生 1 μmol 的产物所需要的酶量为一个活力单位。

$$\text{PC 活力 (U/L)} = \frac{\Delta A_{340} \times V_{总} \times f}{\varepsilon \times d \times V_{样} \times T}$$

注解：

$\Delta A_{空白}$：空白孔变化 OD 值($A_1 - A_2$)

$\Delta A_{测定}$：测定孔变化 OD 值($A_1 - A_2$)

ΔA_{340}：　$\Delta A_{340} = \Delta A_{测定} - \Delta A_{空白}$

ε：显色产物在 340 nm 处的摩尔消光系数，6.22×10^-3 L/μmol/cm

d：酶标板孔光径，0.50 cm

$V_{总}$：反应的总体积，0.2 mL

$V_{样}$：加入反应体系中样本上清液的体积，10 μL = 0.01 mL

C_{pr}：加入检测体系前样本的蛋白浓度，gprot/L

f：样本加入检测体系前的稀释倍数

T：反应时间，5 min

附录1 关键数据

1.技术参数

检测范围	6.43-876.53 U/L	**批间差**	3.9-9.7 %
灵敏度	6.43 U/L	**批内差**	0.6-1.4 %
回收率	91.0-109.5 %		

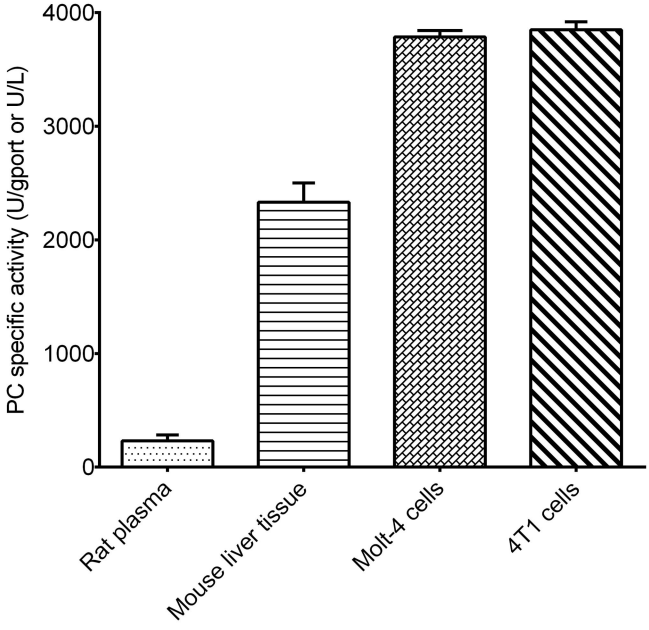
附录2 实例分析

例如小鼠肝组织(数据仅供参考):

取稀释100倍的10%小鼠肝组织匀浆10 μL加入到紫外酶标板孔中,按操作表操作,结果如下:$\Delta A_{测定}$为0.216,$\Delta A_{空白}$为0.020,$\Delta A_{340} = \Delta A_{测定} - \Delta A_{空白} = 0.216 - 0.020 = 0.196$,测定出10%小鼠肝组织的蛋白浓度为11.80 gprot/L,计算结果为:

$$\underset{(U/gprot)}{PC活力} = \frac{0.196 \times 0.20 \times 100}{6.22 \times 10^{-3} \times 0.5 \times 0.01 \times 5 \times 11.80} = 2136.36\ U/gport$$

按说明书操作,测定大鼠血浆(加样量10 μL)、10%小鼠肝组织(10%组织匀浆的蛋白浓度为11.80 gprot/L,稀释100倍,加样量10 μL)、Molt-4细胞(1.24×10^6,蛋白含量为0.35 gprot/L,加样量10 μL)、4T1细胞(1.44×10^6个,蛋白含量为0.52 gprot/L,加样量20 μL)中的PC活力(如下图):



声明

1. 试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，我公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器，严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责，使用前请充分考虑样本可能的使用量，预留充足的样本。