

丙酮酸脱羧酶 (pyruvate decarboxylase,PDC) 活性测定试剂盒说明书

分光光度法 50管/48样

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义：

PDC 主要存在于酵母中，是乙醇发酵的关键酶之一，催化丙酮酸脱羧生成乙醛。

测定原理：

PDC 催化丙酮酸脱羧生成乙醛，添加乙醇脱氢酶 (ADH) 来进一步催化 NADH 还原乙醛生成乙醇和 NAD⁺；NADH 在 340 nm 有吸收峰，而 NAD⁺没有；通过测定 340 nm 光吸收下降速率，来计算 PDC 活性。

组成：

产品名称	FA017-50T/48S	Storage
试剂一：液体	50ml	4°C
试剂二：液体	36ml	4°C
试剂三：液体	5ml	4°C
试剂四：粉剂	1 支	- 20°C
试剂五：液体	60μl	- 20°C
试剂六：液体	5ml	4°C
说明书	一份	

混合试剂：临用前配制，将试剂四和试剂五转移至试剂三中充分溶解待用，用不完的试剂分装后-20°C 保存，禁止反复冻融。

自备仪器和用品：

研钵、冰、台式离心机、紫外分光光度计、1ml 石英比色皿、可调式移液枪和蒸馏水。

粗酶液提取：

- 1、细菌或细胞处理：收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；按照每 200 万细菌或细胞加入 400μl 试剂一，超声波破碎细菌或细胞（功率 200W，工作 3s，间歇 10s，工作 35 次），16000g 4°C离心 20min，取上清，置冰上待测。
- 2、组织处理：按照组织质量 (g)：试剂一体积(ml)为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1ml 试剂一）进行冰浴匀浆，16000g 4°C离心 20min，取上清，置冰上待测。
- 3、血清（浆）等液体样品：直接检测。

最终解释权所有 © 伊势久（江苏连云港）生物科技有限责任公司，保留一切权利



PDC 测定操作:

1. 分光光度计预热 30min, 调节波长到 340 nm, 蒸馏水调零。
2. 试剂二置于 25°C 水浴中预热 30 min。
3. 空白管: 依次在 1ml 石英比色皿中加入 **100μl 蒸馏水**、100μl 混合试剂、700μl 试剂二和 100μl 试剂六, 迅速混匀后于 340nm 比色, 记录 15s 和 75s 的吸光值, 分别记为 A1 和 A2。
4. 测定管: 依次在 1ml 石英比色皿中加入 100μl 上清液、100μl 混合试剂、700μl 试剂二和 100μl 试剂六, 迅速混匀后于 340nm 比色, 记录 15s 和 75s 的吸光值, 分别记为 A3 和 A4。

注意: 空白管只需测定一次。

PDC 活性计算公式:

(1) 按照蛋白浓度计算

活性单位定义: 25°C 中, 每毫克蛋白每分钟催化 1nmol NADH 氧化为 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{PDC (nmol/min/mg prot)} &= \{[(A3 - A4) - (A1 - A2)] \div \epsilon \div d \times V_{\text{总}} \times 10^9\} \div (Cpr \times V_{\text{样}}) \div T \\ &= 1608 \times [(A3 - A4) - (A1 - A2)] \div Cpr \end{aligned}$$

(2) 按照样本质量计算

活性单位定义: 25°C 中, 每克组织每分钟催化 1nmol NADH 氧化为 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{PDC (nmol/min /g 鲜重)} &= \{[(A3 - A4) - (A1 - A2)] \div \epsilon \div d \times V_{\text{总}} \times 10^9\} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 1608 \times [(A3 - A4) - (A1 - A2)] \div W \end{aligned}$$

(3) 按细胞数量计算

活性单位定义: 25°C 中, 每 10⁴ 个细胞每分钟催化 1nmol NADH 氧化为 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{PDC (nmol/min/10}^4\text{cell)} &= \{[(A3 - A4) - (A1 - A2)] \div \epsilon \div d \times V_{\text{总}} \times 10^9\} \div (\text{细胞数量} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 1608 \times [(A3 - A4) - (A1 - A2)] \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

(4) 按血清(浆)体积计算

活性单位定义: 25°C 中, 每毫升血清(浆)每分钟催化 1nmol NADH 氧化为 1 个酶活单位。PDC (nmol/min

$$\begin{aligned} \text{/ml)} &= \{[(A3 - A4) - (A1 - A2)] \div \epsilon \div d \times V_{\text{总}} \times 10^9\} \div V_{\text{样}} \div T \\ &= 1608 \times [(A3 - A4) - (A1 - A2)] \end{aligned}$$

ϵ : NADH 摩尔消光系数, 6.22×10³L/mol/cm; d: 比色皿光径, 1cm; V_总: 反应体系总体积, 1ml=0.001 L, V_样: 加入反应体系中上清液体积, 0.1ml; Cpr: 蛋白浓度 (mg/ml), 需要另外测定, 建议使用本公司 BCA 蛋白质含量试剂盒; W: 样本质量, g; V_{样总}: 加入提取液体积, 1ml; T: 反应时间, 1 min。

