

## 丙酮酸脱羧酶（PDC）活性测定试剂盒说明书

微量法 100T/96S

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<sup>+</sup>；NADH 在 340 nm 有吸收峰，而 NAD<sup>+</sup>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	FA018-100T/96S	Storage
试剂一：液体	100ml	4°C
试剂二：液体	18ml	4°C
试剂三：液体	2.5ml	4°C
试剂四：粉剂	1 支	- 20°C
试剂五：液体	30μl	- 20°C
试剂六：液体	2ml	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/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔板、可调式移液枪

### 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 提取液，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）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/酶标仪预热 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 30min。
3. **空白管:** 依次在微量石英比色皿/96 孔板中加入 20 $\mu$ l 蒸馏水、20 $\mu$ l 混合试剂、140 $\mu$ l 试剂二和 20 $\mu$ l 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:** 依次在微量石英比色皿/96 孔板中加入 20 $\mu$ l 上清液、20 $\mu$ l 混合试剂、140 $\mu$ l 试剂二和 20 $\mu$ l 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:

a. 使用微量石英比色皿测定的计算公式如下

(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。

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

(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。

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

(3) 按细胞数量计算

活性单位定义: 25°C 中, 每 10<sup>4</sup> 个细胞每分钟催化 1nmol NADH 氧化为 1 个酶活单位。

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

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

$\epsilon$ : NADH 摩尔消光系数, 6.22 $\times 10^3$  L/mol/cm; d: 比色皿光径, 1cm; V<sub>总</sub>: 反应体系总体积, 0.2ml=2 $\times 10^{-4}$  L, V<sub>样</sub>: 加入反应体系中上清液体积, 0.02ml; V<sub>样总</sub>: 提取液体积, 1 ml; C<sub>pr</sub>: 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: 样品质量; T: 反应时间, 1 min。

b. 使用 96 孔板测定的计算公式如下

(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。

$$\text{PDC (nmol/min/mg prot)} = \{[(A3 - A4) - (A1 - A2)] \div \epsilon \div d \times V_{\text{总}} \times 10^9\} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T \\ = 3215 \times [(A3 - A4) - (A1 - A2)] \div C_{\text{pr}}$$

(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。

$$\text{PDC (nmol/min /g 鲜重)} = \{[(A3 - A4) - (A1 - A2)] \div \epsilon \div d \times V_{\text{总}} \times 10^9\} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ = 3215 \times [(A3 - A4) - (A1 - A2)] \div W$$

(3) 按细胞数量计算



活性单位定义：25°C中，每 10<sup>4</sup> 个细胞每分钟催化 1nmol NADH 氧化为 1 个酶活单位。

$$\text{PDC (nmol/min/10}^4\text{cell)} = \{[(A3 - A4) - (A1-A2)] \div \epsilon \div d \times V_{\text{总}} \times 10^9\} \div (\text{细胞数量} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$
$$= 3215 \times [(A3 - A4) - (A1-A2)] \div \text{细胞数量}$$

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

$$= 3215 \times [(A3 - A4) - (A1-A2)]$$

$\epsilon$ : NADH 摩尔消光系数, 6.22×10<sup>3</sup>L/mol/cm; d: 96 孔板光径, 0.5 cm; V 总: 反应体系总体积, 0.2ml=2×10<sup>-4</sup> L, V 样: 加入反应体系中上清液体积, 0.02ml; V 样总: 提取液体积, 1 ml; 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 : 样品质量; T: 反应时间, 1 min。

