

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

（货号：ADS-F-FM011-48 分光法 48 样 有效期：3 个月）

一、指标介绍：

丙酮酸脱羧酶（PDC，EC4.1.1.1）。是乙醇发酵的关键酶之一，催化丙酮酸脱羧生成乙醛，存在于酵母和植物体中。

PDC 催化丙酮酸脱羧生成乙醛，乙醇脱氢酶进一步催化 NADH 还原乙醛生成乙醇和 NAD⁺；通过测定 NADH 在 340 nm 处的光吸收下降速率，即可得到 PDC 酶活性大小。

二、试剂盒的组成和配制：

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 60mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	液体 32mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂二	粉体 1 瓶	4℃ 保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部（可手动甩一甩）； 2. 加入 2.1mL 蒸馏水混匀备用； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂三	粉体 2 支	-20℃ 保存	每支： 1. 临用前 8000g 4℃ 离心 2min 使试剂落入管底； 2. 加入 1.1mL 蒸馏水混匀备用，用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融，三天内用完。
试剂四	液体 1 瓶	-20℃ 保存	1. 临用前 8000g 4℃ 离心 2min 使试剂落入管底； 2. 加入 2.1mL 蒸馏水混匀备用； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。

三、实验器材：

研钵（匀浆机）、冰盒（制冰机）、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅（烘箱、培养箱、金属浴）、1ml 石英比色皿、离心管、紫外分光光度计、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

四、指标测定：

建议先选取 1-3 个差异大的样本（例如不同类型或分组）进行预实验，熟悉操作流程，根据预实验结果确定或调整样本浓度，以防造成样本或试剂不必要的浪费！

1、样本提取：

① 组织样本：

称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液，进行冰浴匀浆。12000grrpm，4℃ 离心 10min，取上清，置冰上待测。

【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。

② 细菌/细胞样本：

先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；取 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液；冰浴超声波

破碎细菌或细胞（冰浴，功率 20%或 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；12000rpm，4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照细菌/细胞数量（10⁴个）：提取液（mL）为 1:1000~5000 比例进行提取。

2、检测步骤：

- 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℃）。
- ② 依次在 1mL 石英比色皿中加入：

试剂组分（μL）	测定管
样本	40
试剂一	640
试剂二	40
试剂三	40
试剂四	40
混匀，30℃条件下，10S 时于 340nm 处读取 A1，10min 后读取 A2。ΔA=A1-A2。	

【注】1. 若 ΔA 的值在零附近，可以适当延长反应时间到 30min 或更长读取 A2，改变后的反应时间需代入计算公式重新计算。或适当加大样本量，则改变后的加样体积需代入计算公式重新计算。

2. 若起始值 A 太大如超过 2（如颜色较深的植物叶片，一般色素较高，则起始值相对会偏高），可以适当减少样本加样量，则改变后的加样体积需代入计算公式重新计算。

或向待测样本中加少许活性炭混匀静置 5min 后 12000rpm，4℃离心 10min，上清液用于检测；

3. 若下降趋势不稳定，可以每隔 10S 读取一次吸光值，选取一段线性下降的时间段来参与计算，相对应的 A 值也代入计算公式重新计算。

五、结果计算：

1、按照蛋白浓度计算

酶活定义：30℃条件下，每毫克蛋白每分钟氧化 1nmol NADH 为 1 个酶活单位。

$$\text{PDC (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \div \epsilon \div d \times V2 \times 10^9] \div (\text{Cpr} \times V1) \div T$$

$$= 321.5 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

2、按照样本质量计算

酶活定义：30℃条件下，每克组织每分钟氧化 1nmol NADH 为 1 个酶活单位。

$$\text{PDC (nmol/min /g 鲜重)} = [\Delta A \div \epsilon \div d \times V2 \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T$$

$$= 321.5 \times \Delta A \div W$$

3、按细胞数量计算

酶活定义：30℃条件下，每 10⁴个细胞每分钟氧化 1nmol NADH 为 1 个酶活单位。

$$\text{PDC (nmol/min/10}^4\text{cell)} = [\Delta A \div \epsilon \div d \times V2 \times 10^9] \div (\text{细胞数量} \times V1 \div V) \div T$$

$$= 321.5 \times \Delta A \div \text{细胞数量}$$

4、按液体体积计算

酶活定义：30℃条件下，每毫升液体每分钟氧化 1nmol NADH 为 1 个酶活单位。

$$\text{PDC (nmol/min /mL)} = [\Delta A \div \epsilon \div d \times V2 \times 10^9] \div V1 \div T$$

$$= 321.5 \times \Delta A$$

ε---NADH 摩尔消光系数，6.22×10³L/mol/cm； d---比色皿光径，1cm；

V：加入提取液体积，1mL；

V1---反应体系中上清液体积，0.04mL； V2---反应体系

总体积，0.8mL=8×10⁻⁴ L，

W---样本质量，g ；

T: 反应时间, 10 min;

细胞数量: 500 万;

Cpr: 蛋白浓度 (mg/mL), 建议使用本公司 BCA 蛋白质含量试剂盒。

