

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

(货号: ADS-W-FM011 微板法 96 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 120mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂一	液体 16mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂二	粉体 1 支	4°C 保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部 (可手动甩一甩); 2. 加入 1.1mL 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°C 保存	每支: 1. 开盖前注意使粉体落入底部 (可手动甩一甩); 2. 每支加 0.55mL 蒸馏水混匀备用; 3. 用不完的试剂分装后-20°C 保存, 禁止反复冻融, 三天内用完。
试剂四	液体 1 支	-20°C 保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底(可手动甩一甩); 2. 加入 1.1mL 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)、96 孔板、离心管、酶标仪、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°C 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（ 10^4 个）：提取液（mL）为 1:1000~5000 比例进行提取。

2、检测步骤：

- ① 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 340nm。
- ② 所有试剂解冻至室温（25℃）。
- ② 依次在 96 孔板中加入：

试剂组分（ μL ）	测定管
样本	10
试剂一	160
试剂二	10
试剂三	10
试剂四	10
混匀，30℃条件下，10S 时于 340nm 处读取 A1，10min 后读取 A2。 $\Delta A = A1 - A2$ 。	

【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。

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

$$= 643.1 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

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。

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

$$= 643.1 \times \Delta A \div \text{W}$$

3、按细胞数量计算

酶活定义：30℃条件下，每 10^4 个细胞每分钟氧化 1nmol NADH 为 1 个酶活单位。

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

$$= 643.1 \times \Delta A \div \text{细胞数量}$$

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。

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

$$= 643.1 \times \Delta A$$

ϵ ---NADH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3 \text{L/mol/cm}$ ；

d---比色皿光径，0.5cm；

V：加入提取液体积，1mL；

V1---反应体系中上清液体积，0.01mL；

V2---反应体系总体积, $0.2\text{mL}=2\times 10^{-4}\text{L}$, 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。

