

## 丙酮酸脱羧酶（PDC）活性测定试剂盒说明书

微量法 100T/96S

**注意：**正式测定之前选择2-3个预期差异大的样本做预测定。

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。

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、可调式移液枪和蒸馏水。

试剂组成和配制：

试剂一：液体100mL×1瓶，4℃保存。

试剂二：液体18mL×1瓶，4℃保存。

试剂三：液体2.5mL×1瓶，4℃保存。

试剂四：粉剂×1支，-20℃保存。

试剂五：液体30μL×1瓶，-20℃保存。

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℃保存，禁止反复冻融。

试剂六：液体2mL×1管，4℃保存。

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℃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℃离心20min，取上清，置冰上待测。

3、血清（浆）样品：直接检测。

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℃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20μL蒸馏水、20μL混合试剂、140μL试剂二和20μL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20μL上清液、20μL混合试剂、140μL试剂二和20μL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。

$$\begin{aligned} \text{PDC (nmol/min/mg prot)} &= \{[(A3-A4)-(A1-A2)] \div \epsilon \div d \times V_{\text{总}} \times 109\} \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) \div T \\ &= 1608 \times [(A3-A4)-(A1-A2)] \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

(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。

$$\begin{aligned} \text{PDC (nmol/min /g 鲜重)} &= \{[(A3-A4)-(A1-A2)] \div \epsilon \div d \times V_{\text{总}} \times 109\} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 1608 \times [(A3-A4)-(A1-A2)] \div W \end{aligned}$$

(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。

$$\begin{aligned} \text{PDC (nmol/min/104cell)} &= \{[(A3-A4)-(A1-A2)] \div \epsilon \div d \times V_{\text{总}} \times 109\} \div (\text{细胞数量} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 1608 \times [(A3-A4)-(A1-A2)] \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

(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 /mL) =  $\{[(A3-A4)-(A1-A2)] \div \epsilon \div d \times V_{\text{总}} \times 109\} \div V_{\text{样}} \div T$

$$= 1608 \times [(A3-A4)-(A1-A2)]$$

$\epsilon$ : NADH摩尔消光系数, 6.22×103L/mol/cm; d: 比色皿光径, 1cm;  $V_{\text{总}}$ : 反应体系总体积, 0.2mL=2×10<sup>-4</sup> L,  $V_{\text{样}}$ : 加入反应体系中上清液体积, 0.02mL;  $V_{\text{样总}}$ : 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。

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。

$$\begin{aligned} \text{PDC (nmol/min/mg prot)} &= \{[(A3-A4)-(A1-A2)] \div \epsilon \div d \times V_{\text{总}} \times 109\} \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) \div T \\ &= 3215 \times [(A3-A4)-(A1-A2)] \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

(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。

$$\begin{aligned} \text{PDC (nmol/min /g 鲜重)} &= \{[(A3-A4)-(A1-A2)] \div \epsilon \div d \times V_{\text{总}} \times 109\} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 3215 \times [(A3-A4)-(A1-A2)] \div W \end{aligned}$$

(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。

$$\text{PDC (nmol/min/104cell)} = \{[(A3-A4)-(A1-A2)] \div \epsilon \div d \times V_{\text{总}} \times 109\} \div (\text{细胞数量} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$

=3215×[(A3-A4)-(A1-A2)]÷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) = $\frac{[(A3-A4)-(A1-A2)] \div \epsilon \div d \times V_{\text{总}} \times 10^9}{V_{\text{样}} \div T}$

=3215×[(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<sub>总</sub>: 反应体系总体积, 0.2mL=2×10<sup>-4</sup> 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。