

## 丙酮酸脱羧酶（PDC）活性检测试剂盒（微量法）

产品货号：BA1056

产品规格：100管/96样

### 产品说明：

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。

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340nm有吸收峰，而NAD<sup>+</sup>没有；通过测定340nm光吸收下降速率，来计算PDC活性。

**注意：实验之前建议选择2-3个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。**

### 产品内容：

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液100mL×1瓶	4℃
试剂一	液体18mL×1瓶	4℃
试剂二	液体20mL×1瓶	4℃
试剂三	粉剂×1支	-20℃
试剂四	粉剂×1支	-20℃
试剂五	液体2mL×1瓶	4℃

### 溶液的配制：

1. 提取液：内含不溶物，使用前摇匀；
2. 混合试剂：临用前配制，将试剂三和试剂四用适量试剂二溶解后再全部转移到试剂二中备用。

### 所需的仪器和用品：

台式离心机、紫外分光光度计/酶标仪、水浴锅、微量石英比色皿/96孔（UV板）、可调式移液枪、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水。

### 操作步骤：

#### 一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

##### 1. 细胞或细菌样本的制备：

先收集细胞或细菌样本到离心管内，弃上清，按照每500万细胞或细菌加入1mL提取液，超声波破碎细菌或细胞（功率20%，超声3s，间隔10s，重复30次）。10000rpm，4℃离心20min，取上清，置冰上待测。

##### 2. 组织样本：

称取约0.1g组织，加入1mL提取液，冰上充分研磨。16000g，4℃离心20min，取上清，置冰上待测。

##### 3. 血清（浆）样本：直接检测。

### 测定步骤

1. 紫外分光光度计/酶标仪预热30min以上，调节波长至340nm，蒸馏水调零。
2. 试剂一37℃（哺乳动物）或25℃（其他物种）水浴提前预热30min。
3. 操作表：



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q：807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com

试剂名称 (μL)	测定管	空白管
试剂一	140	140
试剂五	20	20
混合试剂	20	20
样本	20	-
蒸馏水	-	20

迅速混匀后于340nm比色，记录10s和70s的吸光值，测定管的记为A1和A2，空白管的记为A3和A4，计算 $\Delta A = (A1-A2) - (A3-A4)$ 。（空白管只需做1-2次）

### PDC活性计算

#### A. 使用微量石英比色皿测定的计算：

##### 1. 血清（浆）PCD活力的计算：

单位的定义：37℃（哺乳动物）或25℃（其他物种）中，每毫升血清（浆）在反应体系中每分钟催化1μmol NADH氧化定义为一个酶活力单位。

$$PDC (U/mL) = \Delta A \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^6 \div V_{\text{样本}} \div T = 1.6 \times \Delta A$$

##### 2. 组织中PDC活力的计算：

###### （1）按样本蛋白浓度计算：

单位的定义：37℃（哺乳动物）或25℃（其他物种）中，每mg组织蛋白在反应体系中每分钟催化1μmol NADH氧化定义为一个酶活力单位。

$$PDC (U/mg \text{ prot}) = \Delta A \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^6 \div (V_{\text{样本}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 1.6 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

###### （2）按样本质量计算：

单位的定义：37℃（哺乳动物）或25℃（其他物种）中，每g组织质量在反应体系中每分钟催化1μmol NADH氧化定义为一个酶活力单位。

$$PDC (U/g \text{ 质量}) = \Delta A \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^6 \div (W \div V_{\text{提取}} \times V_{\text{样本}}) \div T = 1.6 \times \Delta A \div W$$

##### 3. 细菌或细胞中PDC活力的计算：

###### 按细菌或细胞数量计算：

单位的定义：37℃（哺乳动物）或25℃（其他物种）中，每1万个细菌或细胞在反应体系中每分钟催化1μmol的NADH氧化定义为一个酶活力单位。

$$PDC (U/10^4 \text{ Cell}) = \Delta A \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^6 \div (V_{\text{样本}} \div V_{\text{提取}} \times 500) \div T = 3.2 \times 10^{-3} \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

$\epsilon$ : NADH摩尔消光系数,  $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$ ;  $d$ : 比色皿光径,  $1\text{cm}$ ;  $V_{\text{反应}}$ : 反应体系总体积,  $0.2\text{mL} = 2 \times 10^{-4}\text{L}$ ,  $V_{\text{样本}}$ : 加入反应体系中上清液体积,  $0.02\text{mL}$ ;  $C_{\text{pr}}$ : 蛋白浓度 (mg/mL), 需要另外测定;  $T$ : 反应时间,  $1\text{min}$ ;  $W$ : 样本质量,  $\text{g}$ ;  $V_{\text{提取}}$ : 提取液体积,  $1\text{mL}$ ;  $500$ : 细菌或细胞总数,  $500\text{万}$ ;  $10^6$ : 单位换算系数,  $1\text{mol} = 10^6 \mu\text{mol}$ 。

#### B. 使用96孔UV板测定的计算：

将上述公式中的 $d=1\text{cm}$ （比色皿光径）换为 $d=0.6\text{cm}$ （96孔板光径）进行计算即可。

### 注意事项：

1. 实验时，混合试剂、试剂五和样本在冰上放置，以免变性和失活。
2. 比色皿中反应液的温度必须保持37℃或25℃，取小烧杯一只装入一定量的37℃或25℃蒸馏水，将此烧杯放入37℃或25℃水浴锅中。在反应过程中把比色皿连同反应液放在此烧杯中。
3. 最好两个人同时做此实验，一个人比色，一个人计时，以保证实验结果的准确性。使用96孔板测定时不推荐同时测多个样本。
4. 如果1分钟变化值较小可延长反应时间，同时注意修改计算公式。



扫一扫 加微信

**郑州乐业生物科技有限公司**

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com