

丙酮酸脱羧酶(PDC)活性检测试剂盒

(紫外分光光度法)

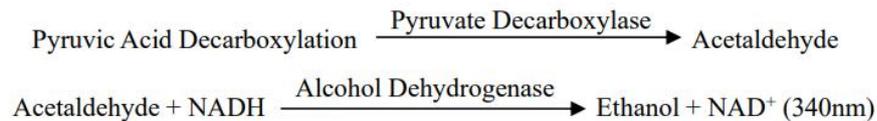
产品货号: BA2100

产品规格: 50T/48S

产品简介:

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⁺; NADH在340nm有吸收峰,而NAD⁺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。

产品组成:

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体60mL×1瓶	2-8℃
试剂一A	液体28mL×1瓶	2-8℃
试剂一B	粉剂×1支	-20℃
试剂一C	液体2mL×1瓶	2-8℃
试剂二A	液体7mL×1瓶	2-8℃
试剂二B	粉剂×1支	-20℃
试剂二C	粉剂×1支	-20℃
试剂三	液体20mL×1瓶	2-8℃

溶液的配制:

1. 提取液:内含不溶物,使用前摇匀。
2. 试剂一的配制:临用前配制,将试剂一B、试剂一C加入到试剂一A中并充分溶解。-20℃分装保存,可保存4周,避免反复冻融。
3. 试剂二B:临用前加入0.6mL蒸馏水溶解,用不完的试剂-20℃分装保存4周,避免反复冻融。
4. 试剂二C:临用前加入1mL蒸馏水溶解,用不完的试剂-20℃分装保存4周,避免反复冻融。
5. 试剂二的配制:临用前配制,取2.625mL试剂二A、0.225mL试剂二B、0.15mL试剂二C混合(共3mL,约30T),现用现配。

需自备的仪器和用品:

台式离心机、紫外分光光度计、水浴锅/恒温培养箱、1mL石英比色皿、可调式移液枪、研钵/匀浆器/细胞超声破碎仪、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200W,超声3s,间隔10s,重复30次)。16000g,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。血清(浆)样本:直接检测。



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

QQ:807961520 731791866

邮箱:zzlybio@126.com

二、测定步骤

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. 根据样本数取适量试剂一、试剂三 37°C（哺乳动物）或 25°C（其他物种）水浴提前预热 30min。
3. 操作表：

试剂名称（ μL ）	测定管	空白管
试剂一	500	500
试剂三	300	300
试剂二	100	100
样本	100	-
蒸馏水	-	100

在比色皿中加入上述试剂后迅速混匀后于 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）。

三、POC 活性计算

1. 血清（浆）PDC 活力的计算：

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

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

2. 按样本蛋白浓度计算：

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

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

3. 按样本质量计算：

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

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

4. 细菌或细胞中 PDC 活力的计算：

单位的定义：37°C（哺乳动物）或 25°C（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 $1\mu\text{mol}$ 的 NADH 氧化定义为一个酶活力单位。

$$\text{PDC (U/10}^4\text{cell)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^6 \div (V_{\text{样本}} \div V_{\text{提取}} \times N) \div T = 1.6 \times \Delta A \div N$$

ϵ : NADH 摩尔消光系数, $6.22 \times 10^3 \text{L/mol/cm}$; d : 比色皿光径, 1cm ; $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, $1\text{mL} = 0.001\text{L}$; $V_{\text{样本}}$: 加入反应体系中上清液体积, 0.1mL ; C_{pr} : 蛋白浓度 (mg/mL), 需要另外测定; T : 反应时间, 1min ; W : 样本质量, g ; $V_{\text{提取}}$: 提取液体积, 1mL ; 10^6 : 单位换算系数, $1\text{mol} = 10^6\mu\text{mol}$; N : 细胞或细胞数量, 以万计。

注意事项：

1. 实验时，试剂二和样本在冰上放置，以免变性和失活。
2. 比色皿中反应液的温度必须保持 37°C 或 25°C，取小烧杯一只装入一定量的 37°C 或 25°C 蒸馏水，将此烧杯放入 37°C 或 25°C 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。
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