

丙酮酸脱羧酶 (PDC) 测试盒说明书(精简版)

(货号: A141-1-1 Pyruvate Decarboxylase Kit, PDC 分光光度法 50T/48 样)

一、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⁺; 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。

NADH 氧化定义为1U。

$$\begin{aligned} \text{PDC活力} &= \frac{\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}}{\epsilon \times d} \times \frac{V_{\text{总}} \times 10^6}{\text{Cpr} \times V_{\text{样}}} \div T \\ &= 1.61 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

二、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。

三、自备仪器或用品:

研钵、冰、台式离心机、紫外分光光度计、1mL石英比色皿、可调式移液枪和蒸馏水。

四、试剂盒组成: (试剂盒有效期 3 个月)

试剂一: 液体×1 瓶, 4℃保存。

试剂二: 液体×1 瓶, 4℃保存。

试剂三: 液体×1 瓶, 4℃保存。

试剂四: 粉剂×1 瓶, -20℃保存。

试剂五: 液体×1 瓶, -20℃保存。

混合试剂: 临用前配制, 小心把试剂四和五转移到试剂三中, 充分溶解。

试剂六: 液体×1 瓶, 4℃保存。

五、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):提取液体积(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。

六、操作步骤:

	空白管	测定管
双蒸水 (mL)	0.1	
待测样本 (mL)		0.1
混合试剂 (mL)	0.1	0.1
试剂二 (mL) (已25℃预温)	0.7	0.7
试剂六 (mL)	0.1	0.1

立即混匀, 计时, 倒入1mL石英比色皿中, 波长340nm, 双蒸水调零, 测定15s吸光度值A₁₅和75s时吸光度值A₇₅; 计算 $\Delta A = A_{15} - A_{75}$ 。

注: 试剂二使用前需在 25℃中预温 30min 以上。

七、单位定义与计算:

1、按照蛋白浓度计算:

活性单位定义: 25℃中, 以每毫克蛋白每分钟催化1μmol

2、按照样本质量计算:

活性单位定义: 25℃中, 以每克组织每分钟催化1μmolNADH 氧化定义为1U。

$$\begin{aligned} \text{PDC活力} &= \frac{\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}}{\epsilon \times d} \times \frac{V_{\text{总}} \times 10^6}{W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}} \div T \\ &= 1.61 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div W \end{aligned}$$

3、按细胞数量计算:

活性单位定义: 25℃中, 以每10⁴个细胞每分钟催化1μmol NADH氧化定义为1U。

$$\begin{aligned} \text{PDC活力} &= \frac{\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}}{\epsilon \times d} \times \frac{V_{\text{总}} \times 10^6}{\text{细胞数} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}} \div T \\ &= 1.61 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div \text{细胞数} \end{aligned}$$

4、按血清 (浆) 体积计算:

活性单位定义: 25℃中, 以每毫升血清 (浆) 每分钟催化 1μmolNADH氧化定义为1U。

$$\begin{aligned} \text{PDC活力} &= \frac{\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}}{\epsilon \times d} \times \frac{V_{\text{总}} \times 10^6}{V_{\text{样}}} \div T \\ &= 1.61 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \end{aligned}$$

注: ε: NADH 摩尔消光系数, 6.22×10³L/mol/cm;

d: 比色皿光径, 1cm;

V_总: 反应体系总体积, 1mL=0.001 L;

V_样: 加入反应体系中上清液体积, 0.1mL;

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: 样本质量, g;

V_{样总}: 加入提取液体, 1mL;

细胞数: 细胞总数量, 10⁴个;

T: 反应时间, 1 min。