

## 丙酮酸脱羧酶（pyruvate decarboxylase,PDC）活性测定试剂盒说明书 （微板法 96 样）

### 一、产品简介：

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<sup>+</sup>；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：

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 120mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	液体 16mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂二	粉体 mg×1 支	4℃ 保存	使用前甩几下使试剂落入底部，再加 1.1mL 蒸馏水混匀备用。
试剂三	粉体 mg×2 支	-20℃ 保存	使用前甩几下使试剂落入底部，每支加 0.55mL 蒸馏水混匀备用，用不完的试剂分装后-20℃ 保存，禁止反复冻融，三天内用完。
试剂四	液体 μL×1 支	-20℃ 保存	使用前甩几下使试剂落入底部，再加 1.1mL 蒸馏水混匀备用。

### 三、所需的仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

### 四、丙酮酸脱羧酶（PDC）活性测定：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

#### 1、样本制备：

##### 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℃ 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<sup>4</sup> 个）：提取液（mL）为 1:1000~5000 比例进行提取。

#### 2、上机检测：

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：

试剂名称（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。△A=A1-A2。	

- 【注】1. 若△A 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。

$$\begin{aligned} \text{PDC (nmol/min/mg prot)} &= [\Delta A \div \epsilon \div d \times V2 \times 10^9] \div (\text{Cpr} \times V1) \div T \\ &= 643.1 \times \Delta A \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

### 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。

$$\begin{aligned} \text{PDC (nmol/min /g 鲜重)} &= [\Delta A \div \epsilon \div d \times V2 \times 10^9] \div (\text{W} \times V1 \div V) \div T \\ &= 643.1 \times \Delta A \div \text{W} \end{aligned}$$

### 3、按细胞数量计算

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

$$\begin{aligned} \text{PDC (nmol/min/10}^4\text{cell)} &= [\Delta A \div \epsilon \div d \times V2 \times 10^9] \div (\text{细胞数量} \times V1 \div V) \div T \\ &= 643.1 \times \Delta A \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

### 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。

$$\begin{aligned} \text{PDC (nmol/min /mL)} &= [\Delta A \div \epsilon \div d \times V2 \times 10^9] \div V1 \div T \\ &= 643.1 \times \Delta A \end{aligned}$$

ε---NADH 摩尔消光系数, 6.22×10<sup>3</sup>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, 0.2mL=2×10<sup>-4</sup> 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。