

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

分光光度法 50 管/48 样

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⁺；NADH 在 340 nm 有吸收峰，而 NAD⁺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、1mL 石英比色皿、可调式移液枪和蒸馏水。

试剂组成和配制：

试剂一：液体 50mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂二：液体 36mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂三：液体 5mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂四：粉剂×1 支，-20℃ 保存。

试剂五：液体 60μL×1 支，-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 5mL×1 瓶，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 500 万细菌或细胞加入 1mL 试剂一，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）等液体样品：直接检测。

PDC 测定操作：

1. 分光光度计预热 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 30 min。

3. 依次在 1mL 石英比色皿中加入 100μL 上清液、100μL 混合试剂、700μL 试剂二和 100μL 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。计算 $\Delta A = A1 - A2$ 。

PDC 活性计算公式：

(1) 按照蛋白浓度计算

活性单位定义：25℃ 中，每毫克蛋白每分钟催化 1nmol NADH 氧化为 1 个酶活单位。

$$\text{PDC (nmol/min/mg prot)} = (\Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{总}} \times 10^9) \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T \\ = 1608 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

(2) 按照样本质量计算

活性单位定义：25℃ 中，每克组织每分钟催化 1nmol NADH 氧化为 1 个酶活单位。

$$\text{PDC (nmol/min/g 鲜重)} = (\Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{总}} \times 10^9) \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ = 1608 \times \Delta A \div W$$

(3) 按细胞数量计算

活性单位定义：25℃中，每 10⁴ 个细胞每分钟催化 1nmol NADH 氧化为 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{PDC (nmol/min/10}^4\text{cell)} &= (\Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{总}} \times 10^9) \div (\text{细胞数量} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 1608 \times \Delta A \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

(4) 按血清（浆）体积计算

活性单位定义：25℃中，每毫升血清（浆）每分钟催化 1nmol NADH 氧化为 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{PDC (nmol/min/mL)} &= (\Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{总}} \times 10^9) \div V_{\text{样}} \div T \\ &= 1608 \times \Delta A \end{aligned}$$

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}: 加入提取液体积, 1mL; T: 反应时间, 1 min。