

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

(货号: G0835F 分光法 48 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^+ ; 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 60mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	液体 32mL×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 2.1mL 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 1.1mL 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 2.1mL 蒸馏水混匀备用。

三、所需的仪器和用品:

紫外分光光度计、1mL 石英比色皿 (光径 1cm)、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。12000g rpm, 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 (10^4 个): 提取液 (mL) 为 1:1000~5000 比例进行提取。

2、上机检测:

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 所有试剂解冻至室温 (25℃)。

② 依次在 1mL 石英比色皿中加入:

试剂名称 (μL)	测定管
样本	40
试剂一	640

试剂二	40
试剂三	40
试剂四	40
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。

$$\begin{aligned} \text{PDC (nmol/min/mg prot)} &= [\Delta A \div \epsilon \div d \times V2 \times 10^9] \div (\text{Cpr} \times V1) \div T \\ &= 321.5 \times \Delta A \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

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。

$$\begin{aligned} \text{PDC (nmol/min /g 鲜重)} &= [\Delta A \div \epsilon \div d \times V2 \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T \\ &= 321.5 \times \Delta A \div W \end{aligned}$$

3、按细胞数量计算

酶活定义: 30℃条件下, 每 10⁴ 个细胞每分钟氧化 1nmol NADH 为 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{PDC (nmol/min/10}^4\text{cell)} &= [\Delta A \div \epsilon \div d \times V2 \times 10^9] \div (\text{细胞数量} \times V1 \div V) \div T \\ &= 321.5 \times \Delta A \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

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。

$$\begin{aligned} \text{PDC (nmol/min /mL)} &= [\Delta A \div \epsilon \div d \times V2 \times 10^9] \div V1 \div T \\ &= 321.5 \times \Delta A \end{aligned}$$

ε---NADH 摩尔消光系数, 6.22×10³L/mol/cm;

d---比色皿光径, 1cm;

V: 加入提取液体积, 1mL;

V1---反应体系中上清液体积, 0.04mL;

V2---反应体系总体积, 0.8mL=8×10⁻⁴ 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。