

丙酮酸脱羧酶(PDC)活性检测试剂盒说明书

Pyruvate Decarboxylase Assay Kit

微量法

货号：AK293

规格：100T/96S

产品组成及保存条件：

编号	规格	储存条件
AK293-A	100mL×1 瓶	4℃保存；
AK293-B	20mL×1 瓶	4℃避光保存；
AK293-C	10mL×1 瓶	4℃避光保存；
AK293-D	液体×1 支	-20℃保存；
AK293-E	液体×1 支	-20℃保存；
混合试剂	临用前配制，小心把 AK293-D、AK293-E 转移到 AK293-C 中，充分溶解。	
AK293-F	5mL×1 管	4℃保存；

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介：

意义：丙酮酸脱羧酶(pyruvate decarboxylase, PDC), EC4.1.1.1, 是一种胞内酶, 是焦磷酸硫胺素依赖性的非氧化酶, 是由辅酶 ThPP、Mg²⁺和蛋白质构成的全酶, PDC 是丙酮酸合成乙醇的关键酶。它广泛存在于酵母菌、霉菌、细菌和植物等多种生物体中。不同来源的丙酮酸脱羧酶的结构、相对分子质量、酶学性质等均不尽相同。

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。

自备用品：

研钵、冰、台式离心机、紫外分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔板、可调式移液枪和蒸馏水。

粗酶液提取：

1. 组织样本的制备：

按照组织质量 (g)：AK293-A 体积(mL)为 1：5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL AK293-A) 进行冰浴匀浆, 16000g 4℃离心 20min, 取上清, 置冰上待测。

2. 细菌或细胞样本的制备：

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。

3. 血清 (浆) 样品：直接检测。

测定步骤

- 分光光度计/酶标仪预热 30min, 调节波长到 340 nm, 蒸馏水调零。
- AK293-B 在 25℃水浴锅中预热 30 min。
- 在微量石英比色皿/96 孔板中按顺序加入下列试剂

试剂名称	空白管 (μL)	测定管 (μL)
蒸馏水	20	
混合试剂	20	
AK293-B	140	

AK293-F	20	
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。		
上清液		20
混合试剂		20
AK293-B		140
AK293-F		20
迅速混匀后于 340nm 比色, 记录 15s 和 75s 的吸光值, 分别记为 A3 和 A4。		

注意: 空白管只需测定一次。

PDC 活性计算:

a. 使用微量石英比色皿测定的计算公式如下

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 1μmol NADH 氧化为 1 个酶活单位。

$$\text{PDC } (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot}) = \{[(A3-A4)-(A1-A2)] \div \epsilon \div d \times V_{\text{总}} \times 10^6\} \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) \div T$$

$$= 1.61 \times [(A3-A4)-(A1-A2)] \div \text{Cpr}$$

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1μmol NADH 氧化为1 个酶活单位。

$$\text{PDC } (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}) = \{[(A3-A4)-(A1-A2)] \div \epsilon \div d \times V_{\text{总}} \times 10^6\} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$

$$= 1.61 \times [(A3-A4)-(A1-A2)] \div W$$

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1μmol NADH 氧化为1 个酶活单位。

$$\text{PDC } (\mu\text{mol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) = \{[(A3-A4)-(A1-A2)] \div \epsilon \div d \times V_{\text{总}} \times 10^6\} \div (\text{细胞数量} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$

$$= 1.61 \times [(A3-A4)-(A1-A2)] \div \text{细胞数量}$$

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1μmol NADH 氧化为1 个酶活单位。

$$\text{PDC } (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}) = \{[(A3-A4)-(A1-A2)] \div \epsilon \div d \times V_{\text{总}} \times 10^6\} \div V_{\text{样}} \div T = 1.61 \times [(A3-A4)-(A1-A2)]$$

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, 0.2mL=2×10⁻⁴ L, V_样: 加入反应体系中上清液体积, 0.02mL; V_{样总}: 提取液体积, 1 mL; 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: 样品质量; T: 反应时间, 1 min。

b. 使用 96 孔板测定的计算公式如下:

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 1μmol NADH 氧化为 1 个酶活单位。

$$\text{PDC } (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot}) = \{[(A3-A4)-(A1-A2)] \div \epsilon \div d \times V_{\text{总}} \times 10^6\} \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) \div T$$

$$= 3.22 \times [(A3-A4)-(A1-A2)] \div \text{Cpr}$$

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 1μmol NADH 氧化为 1 个酶活单位。

$$\text{PDC } (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}) = \{[(A3-A4)-(A1-A2)] \div \epsilon \div d \times V_{\text{总}} \times 10^6\} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$

$$= 3.22 \times [(A3-A4)-(A1-A2)] \div W$$

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 1μmol NADH 氧化为 1 个酶活单位。

$$\text{PDC } (\mu\text{mol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) = \{[(A3-A4)-(A1-A2)] \div \epsilon \div d \times V_{\text{总}} \times 10^6\} \div (\text{细胞数量} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 3.22 \times [(A3-A4)-(A1-A2)] \div \text{细胞数量}$$

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 1μmol NADH 氧化为 1 个酶活单位。

$$\text{PDC } (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}) = \{[(A3-A4)-(A1-A2)] \div \epsilon \div d \times V_{\text{总}} \times 10^6\} \div V_{\text{样}} \div T = 3.22 \times [(A3-A4)-(A1-A2)]$$

注： ε：NADH 摩尔消光系数，6.22×10³L/mol/cm；d：96 孔板光径，0.5 cm；V_总：反应体系总体积，0.2mL=2×10⁻⁴ L，V_样：加入反应体系中上清液体积，0.02mL；V_{样总}：提取液体积，1 mL；C_{pr}：蛋白浓度（mg/mL）；W：样品质量；T：反应时间，1 min。

注意事项：

1. 配制好的混合液 3 天内使用完。
2. 蛋白定量检测建议使用本公司：BCA Protein Assay Kit (C05-02001)