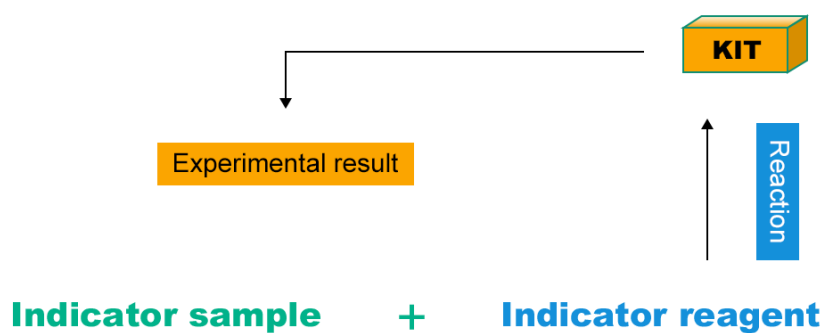


上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0314

Size: 100T/96S

丙酮酸脱羧酶 (PDC) 检测试剂盒说明书

微量法

*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

一、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。二、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。

三、需自备的仪器和用品:

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 (ZC-1036: UV板)、可调式移液枪和蒸馏水。

四、试剂的组成和配置:

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
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	液体×1 瓶	-20℃保存	
试剂六	液体×1 管	4℃保存	
混合试剂: 临用前配制, 小心把试剂四转移到试剂三中, 充分溶解			

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400 μ L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）：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）样品：直接检测。

六、PDC 测定操作：

1. 分光光度计/酶标仪预热30min，调节波长到340nm，蒸馏水调零。
2. 试剂二置于25℃水浴中预热30min。
3. 空白管：依次在微量石英比色皿/96孔板（UV板）中加入20 μ L蒸馏水、20 μ L混合试剂、140 μ L试剂二和20 μ L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。
4. 测定管：依次在微量石英比色皿/96孔板（UV板）中加入20 μ L上清液、20 μ L混合试剂、140 μ L试剂二和20 μ L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A3和A4。

注意：空白管只需测定一次。

七、PDC 活性计算：

- 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1 μ mol NADH 氧化为1个酶活单位。

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

（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 1 μ mol NADH 氧化为 1 个酶活单位。

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

(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1 μmol 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1 μmol NADH氧化为1个酶活单位。

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

ϵ : NADH 摩尔消光系数, $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$; d : 比色皿光径, 1cm; $V_{\text{总}}$: 反应体系总体积, $0.2\text{mL} = 2 \times 10^{-4}\text{L}$, $V_{\text{样}}$: 加入反应体系中上清液体积, 0.02mL; $V_{\text{样总}}$: 提取液体积, 1 mL; C_{pr} : 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。

● 使用96孔板（UV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1 μmol NADH氧化为1个酶活单位。

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

(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 1 μmol NADH 氧化为1个酶活单位。

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

(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1 μmol NADH氧化为1个酶活单位。

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

(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1 μmol NADH 氧化为1个酶活单位。

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

ε : NADH摩尔消光系数, $6.22 \times 10^3 \text{ L}/\text{mol}/\text{cm}$; d : 96孔板 (UV板) 光径, 0.5 cm; $V_{\text{总}}$: 反应体系总体积, $0.2\text{mL} = 2 \times 10^{-4} \text{ L}$, $V_{\text{样}}$: 加入反应体系中上清液体积, 0.02mL; $V_{\text{样总}}$: 提取液体积, 1mL; C_{pr} : 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, 1min。

七、注意事项:

配制好的混合液 3 天内使用完。