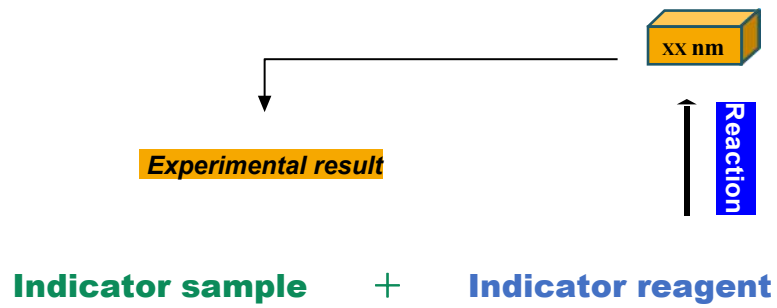


上海茁彩生物科技有限公司
Shanghai zcibio technology Co., Ltd.



生化检测原理示意图

丙酮酸脱羧酶（PDC）活性测定试剂盒说明书

紫外分光光度法

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340nm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：

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	粉剂×1 瓶	-20℃保存	-
试剂五	液体×1 瓶	-20℃保存	-
试剂六	液体×1 瓶	4℃保存	-
混合试剂：临用前配制，小心把试剂四和五转移到试剂三中，充分溶解。			

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 μL 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30min。
3. 空白管：依次在 1mL 石英比色皿中加入100 μL蒸馏水、100 μL混合试剂、700 μL试剂二和100 μL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1mL石英比色皿中加入100 μL上清液、100 μL混合试剂、700 μL试剂二和100 μL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。

PDC 活性计算公式：

(1) 按照蛋白浓度计算

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

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

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

(2) 按照样本质量计算

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

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

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

(3) 按细胞数量计算

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

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

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

(4) 按血清（浆）体积计算

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

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

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

ε：NADH 摩尔消光系数，6.22×10³ L/mol/cm；d：比色皿光径，1cm；V_总：反应体系总体积，1mL=0.001L，V_样：加入反应体系中上清液体积，0.1mL；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：样本质量，g；V_{样总}：加入提取液体积，1mL；T：反应时间，1 min。

注意事项：

配制好的混合液 3 天内使用完。