

丙酮酸脱羧酶(PDC)活性检测试剂盒说明书

Pyruvate Decarboxylase Assay Kit

分光光度法

货号: AK292

规格: 50T/48S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
AK292-A	50mL×1 瓶	4℃保存;
AK292-B	36mL×1 瓶	4℃避光保存;
AK292-C	10mL×1 瓶	4℃避光保存;
AK292-D	粉剂×1 支	-20℃保存;
AK292-E	液体×1 支	-20℃保存
混合试剂	临用前配制, 小心把 AK292-D、AK292-E 转移到 AK292-C 中, 充分溶解。	
AK292-F	5mL×1 瓶	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、1mL 石英比色皿、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): AK292-A 体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL AK292-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。
- AK292-B 在 25℃水浴锅中预热 30 min。
- 在 1mL 石英比色皿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	100	
混合试剂	100	
AK292-B	700	

AK292-F	100	
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		100
混合试剂		100
AK292-B		700
AK292-F		100
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 1-2 次。

PDC 活性计算：

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。

$$\begin{aligned} \text{PDC (U/mg prot)} &= \{[(A3-A4)-(A1-A2)] \div \epsilon \div d \times V_{\text{总}} \times 10^6\} \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) \div T \\ &= 1.61 \times [(A3-A4)-(A1-A2)] \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

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。

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

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。

$$\begin{aligned} \text{PDC (U/10}^4 \text{ cell)} &= \{[(A3-A4)-(A1-A2)] \div \epsilon \div d \times V_{\text{总}} \times 10^6\} \div (\text{细胞数量} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 1.61 \times [(A3-A4)-(A1-A2)] \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

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1μmol NADH 氧化为1 个酶活单位。

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

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，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。

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)