

丙酮酸脱羧酶（PDC）检测试剂盒（微量法）

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 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。

试剂组成和配制：

试剂一：液体 100mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂二：液体 18mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂三：液体 2.5mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂四：粉剂×1 支，-20℃ 保存。

试剂五：液体 30μL×1 瓶，-20℃ 保存。

混合试剂：临用前配制，将试剂四和试剂五转移至试剂三中充分溶解待用，用不完的试剂分装后-20℃ 保存，禁止反复冻融。

试剂六：液体 2mL×1 管，4℃ 保存。

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 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。
- 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。

PDC 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。
- 试剂二置于 25℃ 水浴中预热 30min。
- 空白管：**依次在微量石英比色皿/96 孔板中加入 20μL 蒸馏水、20μL 混合试剂、140μL 试剂二和 20μL 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。
- 测定管：**依次在微量石英比色皿/96 孔板中加入 20μL 上清液、20μL 混合试剂、140μL 试剂二和 20μL 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。

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 1nmol NADH 氧化为 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{PDC (nmol/min/mg prot)} &= \{[(A3-A4)-(A1-A2)] \div \epsilon \cdot d \times V_{\text{总}} \times 10^9\} \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) \div T \\ &= 1608 \times [(A3-A4)-(A1-A2)] \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

(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 1nmol NADH 氧化为 1 个酶活单位。

$$\text{PDC (nmol/min /g 鲜重)} = \{[(A3 - A4) - (A1 - A2)] \div \epsilon \div d \times V_{\text{总}} \times 10^9\} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$

$$= 1608 \times [(A3 - A4) - (A1 - A2)] \div W$$

(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 1nmol NADH 氧化为 1 个酶活单位。

$$\text{PDC (nmol/min/10}^4\text{cell)} = \{[(A3 - A4) - (A1 - A2)] \div \epsilon \div d \times V_{\text{总}} \times 10^9\} \div (\text{细胞数量} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$

$$= 1608 \times [(A3 - A4) - (A1 - A2)] \div \text{细胞数量}$$

(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 1nmol NADH 氧化为 1 个酶活单位。PDC

$$\text{(nmol/min /mL)} = \{[(A3 - A4) - (A1 - A2)] \div \epsilon \div d \times V_{\text{总}} \times 10^9\} \div V_{\text{样}} \div T$$

$$= 1608 \times [(A3 - A4) - (A1 - A2)]$$

ϵ : NADH 摩尔消光系数, 6.22×10³L/mol/cm;

d : 比色皿光径, 1cm;

$V_{\text{总}}$: 反应体系总体积, 0.2mL=2×10⁻⁴ 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;

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 1nmol NADH 氧化为 1 个酶活单位。

$$\text{PDC (nmol/min/mg prot)} = \{[(A3 - A4) - (A1 - A2)] \div \epsilon \div d \times V_{\text{总}} \times 10^9\} \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) \div T$$

$$= 3215 \times [(A3 - A4) - (A1 - A2)] \div \text{Cpr}$$

(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 1nmol NADH 氧化为 1 个酶活单位。

$$\text{PDC (nmol/min /g 鲜重)} = \{[(A3 - A4) - (A1 - A2)] \div \epsilon \div d \times V_{\text{总}} \times 10^9\} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$

$$= 3215 \times [(A3 - A4) - (A1 - A2)] \div W$$

(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 1nmol NADH 氧化为 1 个酶活单位。

$$\text{PDC (nmol/min/10}^4\text{cell)} = \{[(A3 - A4) - (A1 - A2)] \div \epsilon \div d \times V_{\text{总}} \times 10^9\} \div (\text{细胞数量} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$

$$= 3215 \times [(A3 - A4) - (A1 - A2)] \div \text{细胞数量}$$

(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 1nmol NADH 氧化为 1 个酶活单位。PDC

$$\text{(nmol/min /mL)} = \{[(A3 - A4) - (A1 - A2)] \div \epsilon \div d \times V_{\text{总}} \times 10^9\} \div V_{\text{样}} \div T$$

$$= 3215 \times [(A3 - A4) - (A1 - A2)]$$

ϵ : NADH 摩尔消光系数, 6.22×10³L/mol/cm;

d : 96 孔板光径, 0.5 cm;

$V_{\text{总}}$: 反应体系总体积, 0.2mL=2×10⁻⁴ 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;

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 全。