

## 丙酮酸脱羧酶（PDC）活性检测试剂盒说明书

微量法

**注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。**

货号：BC1075

规格：100T/96S

**产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。**

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 110 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂一 A	液体 14 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂一 B	粉剂×1 支	-20°C保存
试剂一 C	液体 1mL×1 支	2-8°C保存
试剂二 A	液体 3 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂二 B	粉剂×1 支	-20°C保存
试剂二 C	粉剂×1 支	-20°C保存
试剂三	液体 10 mL×1 瓶	2-8°C保存

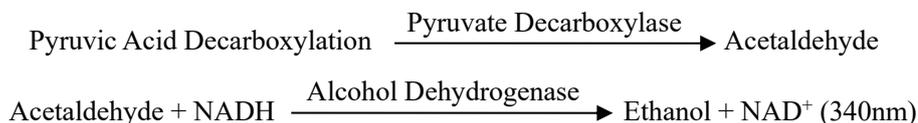
溶液的配制：

- 1、提取液：内含不溶物，使用前摇匀。
- 2、试剂一的配制：临用前配制，将试剂一 B、试剂一 C 加入到试剂一 A 中并充分溶解。-20°C分装保存，可保存 1 个月，避免反复冻融。
- 3、试剂二 B：临用前加入 0.3mL 蒸馏水溶解，用不完的试剂-20°C分装保存 4 周，避免反复冻融。
- 4、试剂二 C：临用前加入 1mL 蒸馏水溶解，用不完的试剂-20°C分装保存 4 周，避免反复冻融。
- 5、试剂二的配制：临用前配制，取 1.305mL 试剂二 A、0.12mL 试剂二 B、0.075mL 试剂二 C 混合（共 1.5mL，约 75T），现用现配。

### 产品说明：

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。

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<sup>+</sup>；NADH在340nm有吸收峰，而NAD<sup>+</sup>没有；通过测定340nm光吸收下降速率，来计算PDC活性。



**注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。**

### 需自备的仪器和用品：

台式离心机、紫外分光光度计/酶标仪、水浴锅/恒温培养箱、微量石英比色皿/ 96孔UV板、可调式移液枪、研钵/匀浆器/细胞超声破碎仪、冰和蒸馏水。

## 操作步骤:

### 一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

1、细胞或细菌样本的制备：先收集细胞或细菌样本到离心管内，弃上清，按照每 500 万细胞或细菌加入 1mL 提取液，超声波破碎细菌或细胞（功率 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）。16000g，4℃离心 20min，取上清，置冰上待测。

2、组织样本：称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液，冰上充分研磨。16000g，4℃离心 20min，取上清，置冰上待测。

3、血清（浆）样本：直接检测。

### 二、操作步骤

1、紫外分光光度计/酶标仪预热30min以上，调节波长至340nm，紫外分光光度计用蒸馏水调零。

2、根据样本数取适量试剂一、试剂三37℃提前预热30min.

3、操作表：（在微量石英比色皿/96孔UV板中按下表顺序加入试剂）

试剂名称（ $\mu\text{L}$ ）	测定管	空白管
试剂一	100	100
试剂三	60	60
试剂二	20	20
样本	20	-
蒸馏水	-	20

迅速混匀后于 340nm 比色，记录 10s 和 70s 的吸光值，测定管的记为 A1 和 A2，空白管的记为 A3 和 A4，计算  $\Delta A = (A1 - A2) - (A3 - A4)$ 。（空白管只需做 1-2 次）

### 三、PDC活性计算

#### A.使用微量石英比色皿测定的计算:

1、血清（浆）PDC活力的计算:

单位定义：在37℃条件下，每毫升血清（浆）在反应体系中每分钟催化1 $\mu\text{mol}$  NADH氧化定义为一个酶活力单位。

$$\text{PDC (U/mL)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^6 \div V_{\text{样本}} \div T = 1.61 \times \Delta A$$

2、按样本蛋白浓度计算:

单位定义：在37℃条件下，每mg组织蛋白在反应体系中每分钟催化1 $\mu\text{mol}$  NADH氧化定义为一个酶活力单位。

$$\text{PDC (U/mg prot)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^6 \div (V_{\text{样本}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 1.61 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

3、按样本质量计算:

单位定义：在37℃条件下，每g组织质量在反应体系中每分钟催化1 $\mu\text{mol}$  NADH氧化定义为一个酶活力单位。

$$\text{PDC (U/g 质量)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^6 \div (W \div V_{\text{提取}} \times V_{\text{样本}}) \div T = 1.61 \times \Delta A \div W$$

4、细菌或细胞中PDC活力的计算:

单位的定义：在37℃条件下，每1万个细菌或细胞在反应体系中每分钟催化1 $\mu\text{mol}$ 的NADH氧化定义为一个酶活力单位。

$$\text{PDC (U/10}^4 \text{ Cell)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^6 \div (V_{\text{样本}} \div V_{\text{提取}} \times N) \div T = 1.61 \times \Delta A \div N$$

$\epsilon$ : NADH摩尔消光系数,  $6.22 \times 10^3 \text{L/mol/cm}$ ;  $d$ : 比色皿光径,  $1\text{cm}$ ;  $V_{\text{反总}}$ : 反应体系总体积,  $2 \times 10^{-4}\text{L}$ ;  $V_{\text{样本}}$ : 加入反应体系中上清液体积,  $0.02\text{mL}$ ;  $C_{\text{pr}}$ : 蛋白浓度 ( $\text{mg/mL}$ ), 需要另外测定;  $T$ : 反应时间,  $1\text{min}$ ;  $W$ : 样本质量,  $\text{g}$ ;  $V_{\text{提取}}$ : 提取液体积,  $1\text{mL}$ ;  $N$ : 细菌或细胞总数, 以万计;  $10^6$ : 单位换算系数,  $1\text{mol}=10^6\mu\text{mol}$ 。

### B.使用96孔UV板测定的计算:

#### 1、血清(浆)PDC活力的计算:

单位定义: 在 $37^\circ\text{C}$ 条件下, 每毫升血清(浆)在反应体系中每分钟催化 $1\mu\text{mol}$  NADH氧化定义为一个酶活力单位。

$$\text{PDC (U/mL)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^6 \div V_{\text{样本}} \div T = 2.68 \times \Delta A$$

#### 2、按样本蛋白浓度计算:

单位定义: 在 $37^\circ\text{C}$ 条件下, 每 $\text{mg}$ 组织蛋白在反应体系中每分钟催化 $1\mu\text{mol}$  NADH氧化定义为一个酶活力单位。

$$\text{PDC (U/mg prot)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^6 \div (V_{\text{样本}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 2.68 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

#### 3、按样本质量计算:

单位定义: 在 $37^\circ\text{C}$ 条件下, 每 $\text{g}$ 组织质量在反应体系中每分钟催化 $1\mu\text{mol}$  NADH氧化定义为一个酶活力单位。

$$\text{PDC (U/g 质量)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^6 \div (W \div V_{\text{提取}} \times V_{\text{样本}}) \div T = 2.68 \times \Delta A \div W$$

#### 4、细菌或细胞中PDC活力的计算:

单位定义: 在 $37^\circ\text{C}$ 条件下, 每1万个细菌或细胞在反应体系中每分钟催化 $1\mu\text{mol}$ 的NADH氧化定义为一个酶活力单位。

$$\text{PDC (U/10}^4 \text{ Cell)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^6 \div (V_{\text{样本}} \div V_{\text{提取}} \times N) \div T = 2.68 \times \Delta A \div N$$

$\epsilon$ : NADH摩尔消光系数,  $6.22 \times 10^3 \text{L/mol/cm}$ ;  $d$ : 比色皿光径,  $0.6\text{cm}$ ;  $V_{\text{反总}}$ : 反应体系总体积,  $2 \times 10^{-4}\text{L}$ ;  $V_{\text{样本}}$ : 加入反应体系中上清液体积,  $0.02\text{mL}$ ;  $C_{\text{pr}}$ : 蛋白浓度 ( $\text{mg/mL}$ ), 需要另外测定;  $T$ : 反应时间,  $1\text{min}$ ;  $W$ : 样本质量,  $\text{g}$ ;  $V_{\text{提取}}$ : 提取液体积,  $1\text{mL}$ ;  $N$ : 细菌或细胞总数, 以万计;  $10^6$ : 单位换算系数,  $1\text{mol}=10^6\mu\text{mol}$ 。

### 注意事项:

- 1、实验时, 试剂二和样本在冰上放置, 以免变性和失活。
- 2、比色皿中反应液的温度必须保持  $37^\circ\text{C}$ 或  $25^\circ\text{C}$ , 可以取小烧杯一只装入一定量的  $37^\circ\text{C}$ 或  $25^\circ\text{C}$ 蒸馏水, 将此烧杯放入  $37^\circ\text{C}$ 或  $25^\circ\text{C}$ 水浴锅中。在反应过程中把比色皿连同反应液放在此烧杯中; 或者使用浮漂固定比色皿放入水浴锅; 或者使用恒温培养箱等。
- 3、最好两个人同时做此实验, 一个人比色, 一个人计时, 以保证实验结果的准确性。使用 96 孔板测定时不推荐同时测多个样本。
- 4、如果 1 分钟变化值较小可延长反应时间, 同时注意修改计算公式。

### 实验实例:

- 1、取  $0.1\text{g}$  绿萝叶加入  $1\text{mL}$  提取液进行匀浆研磨, 取上清, 之后按照测定步骤操作, 用微量石英比色皿测得计算  $\Delta A = (A_1 - A_2) - (A_3 - A_4) = (0.9557 - 0.9299) - (0.7363 - 0.7301) = 0.0196$ , 按样本质量计算酶活得:  $\text{PDC (U/g 质量)} = 1.6 \times \Delta A \div W = 1.6 \times 0.0196 \div 0.1 = 0.3136 \text{ U/g 质量}$ 。

2、取 0.1g 小鼠肝脏加入 1mL 提取液进行匀浆研磨，取上清用蒸馏水稀释 40 倍后按照测定步骤操作，用微量石英比色皿测得计算  $\Delta A = (A1-A2) - (A3-A4) = (0.703-0.468) - (0.7363-0.7301) = 0.2288$ ，按样本质量计算酶活得：

$PDC (U/g \text{ 质量}) = 1.6 \times \Delta A \div W = 1.6 \times 0.2288 \div 0.1 \times 40 (\text{稀释倍数}) = 146.432 U/g \text{ 质量}。$

#### **相关发表文献：**

[1] Chong Li, Shi Gao, Xiaotong Li, et al. Efficient metabolic evolution of engineered *Yarrowia lipolytica* for succinic acid production using a glucose-based medium in an in situ fibrous bioreactor under low-pH condition. *Biotechnology for Biofuels*. August 2018; (IF5.452)

#### **相关系列产品：**

- BC0590/BC0595 游离脂肪酸（FFA）含量检测试剂盒
- BC2340/BC2345 脂肪酶（LPS）活性检测试剂盒
- BC0320/BC0325 植物中脂氧合酶（LOX）活性检测试剂盒
- BC0750/BC0755 乙醛脱氢酶（ALDH）活性检测试剂盒