



丙酮酸脱羧酶（PDC）活性检测试剂盒说明书

紫外分光光度法

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：BC1070

规格：50T/48S

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 60 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂一 A	液体 28 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 2mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂二 A	液体 7 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 20 mL×1 瓶	2-8°C保存

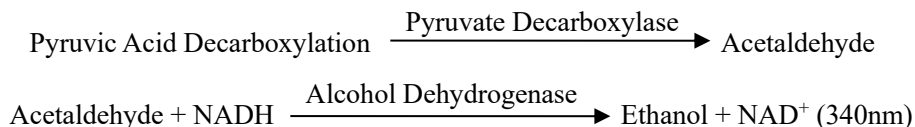
溶液的配制：

- 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 4 周，避免反复冻融。
- 3、试剂二 B：临用前加入 0.6mL 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 2.625mL 试剂二 A、0.225mL 试剂二 B、0.15mL 试剂二 C 混合（共 3mL，约 30T），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⁺；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。



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、水浴锅/恒温培养箱、1mL石英比色皿、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、测定步骤

1、紫外分光光度计预热30min以上，调节波长至340nm，蒸馏水调零。

2、根据样本数取适量试剂一、试剂三37℃（哺乳动物）或25℃（其他物种）水浴提前预热30min。

3、操作表：

试剂名称（μL）	测定管	空白管
试剂一	500	500
试剂三	300	300
试剂二	100	100
样本	100	-
蒸馏水	-	100

在比色皿中加入上述试剂后迅速混匀后于 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

1、血清（浆）PDC活力的计算：

单位的定义：37℃（哺乳动物）或25℃（其他物种）中，每毫升血清（浆）在反应体系中每分钟催化1μmol NADH氧化定义为一个酶活力单位。

$$PDC (U/mL) = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^6 \div V_{\text{样本}} \div T = 1.6 \times \Delta A$$

2、按样本蛋白浓度计算：

单位的定义：37℃（哺乳动物）或25℃（其他物种）中，每mg组织蛋白在反应体系中每分钟催化1μmol NADH氧化定义为一个酶活力单位。

$$PDC (U/mg \text{ prot}) = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^6 \div (V_{\text{样本}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 1.6 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

3、按样本质量计算：

单位的定义：37℃（哺乳动物）或25℃（其他物种）中，每g组织质量在反应体系中每分钟催化1μmol NADH氧化定义为一个酶活力单位。

$$PDC (U/g \text{ 质量}) = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^6 \div (W \div V_{\text{提取}} \times V_{\text{样本}}) \div T = 1.6 \times \Delta A \div W$$

4、细菌或细胞中PDC活力的计算：

单位的定义：37℃（哺乳动物）或25℃（其他物种）中，每1万个细菌或细胞在反应体系中每分钟催化1μmol的NADH氧化定义为一个酶活力单位。

$$PDC (U/10^4 \text{ cell}) = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^6 \div (V_{\text{样本}} \div V_{\text{提取}} \times N) \div T = 1.6 \times \Delta A \div N$$

ϵ : NADH摩尔消光系数, $6.22 \times 10^3 \text{L/mol/cm}$; d : 比色皿光径, 1cm ; $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, $1\text{mL}=0.001\text{L}$; $V_{\text{样本}}$: 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; T : 反应时间, 1min ; W : 样本质量, g ; $V_{\text{提取}}$: 提取液体积, 1mL ; 10^6 : 单位换算系数, $1\text{mol}=10^6\mu\text{mol}$; N : 细胞或细胞数量, 以万计。

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°C 或 25°C , 取小烧杯一只装入一定量的 37°C 或 25°C 蒸馏水, 将此烧杯放入 37°C 或 25°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。
- 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。
- 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 0.1g 绿萝叶加入 1mL 提取液进行匀浆研磨, 取上清, 之后按照测定步骤操作, 用 1mL 石英比色皿测得计算 $\Delta A = (A_1 - A_2) - (A_3 - A_4) = (0.945 - 0.93) - (0.716 - 0.714) = 0.013$, 按样本质量计算酶活得:
 $\text{PDC (U/g 质量)} = 1.6 \times \Delta A \div W = 1.6 \times 0.013 \div 0.1 = 0.208 \text{ U/g 质量}$ 。
- 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 1mL 石英比色皿测得计算 $\Delta A = (A_1 - A_2) - (A_3 - A_4) = (0.602 - 0.322) - (0.716 - 0.714) = 0.278$, 按样本质量计算酶活得:
 $\text{PDC (U/g 质量)} = 1.6 \times \Delta A \div W = 1.6 \times 0.278 \div 0.1 \times 40$ (稀释倍数) $= 177.92 \text{ U/g 质量}$ 。

相关发表文献:

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