CheKine™ 丙酮酸脱羧酶（PDC）检测试剂盒（微量法）

Cat #: KTB1125 Size: 48 T/48 S 96 T/96 S

	丙酮酸脱羧酶（PDC）检测试剂盒（微量法）		
REF	**货号：**KTB1125	LOT	**批号：**见产品标签
	适用样本：动物或植物组织、细胞或细菌、血清（浆）		
	保质期：4℃，避光保存 6 个月		

原理

丙酮酸脱羧酶(pyruvate decarboxylase, 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。CheKine™ 丙酮酸脱羧酶（PDC）活性检测试剂盒（微量法）可检测动物或植物组织、细胞或细菌、血清（浆）等样本中 PDC 的活性，其原理是 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 有特征吸收峰，而 NAD^+没有，通过测定 340 nm 光吸收下降速率，来计算 PDC 活性。

包装清单

试剂盒组分	规格		储存条件
	48 T	**96 T**	
Extraction Buffer	60 mL	60 mL×2	4℃
Reagent Ⅰ	9 mL	18 mL	-20℃，避光保存
Reagent Ⅱ	1.5 mL	3 mL	4℃
Reagent Ⅲ	Powder×1 vial	Powder×1 vial	-20℃，避光保存
Reagent Ⅳ	2.25 μL	4.5 μL	-20℃，避光保存
Reagent Ⅴ	1.2 mL	2.4 mL	4℃，避光保存

注意：正式检测前，建议选择 2-3 个预期差异较大的样本进行预实验。

自备耗材

- 酶标仪或紫外分光光度计（能测 340 nm 处的吸光度）
- 96 孔 UV 板或微量石英比色皿、可调节式移液枪及枪头
- 低温离心机、水浴锅
- 去离子水
- 匀浆器（如果是组织样本）

Abbkine, Inc • • www.abbkine.com
Not for further distribution without written consent.Copyright © Abbkine, Inc.

试剂准备

Extraction Buffer：即用型；使用前，平衡到室温；4℃保存。

注意：Extraction Buffer 有毒且有不溶物，建议在通风橱进行实验，使用前摇匀。

Reagent Ⅰ：即用型；使用前，平衡到室温；-20℃避光保存。

Reagent Ⅱ：即用型；使用前，平衡到室温；4℃保存。

Working Reagent：临用前配制，将 ReagentⅢ和 ReagentⅣ用适量 Reagent Ⅱ溶解后，再全部转移到 Reagent Ⅱ中备用。用不完的试剂-20℃避光分装保存一周，避免反复冻融。

Reagent Ⅴ：即用型；使用前，平衡到室温；4℃避光保存。

样本制备

注意：1. 推荐使用新鲜样本，如果不立即进行实验，样本可在-80℃保存一个月。

1. 动物组织：称取约 0.1 g 样本，加入 1 mL Extraction Buffer，冰浴匀浆，10,000 g，4℃离心 10 min，取上清液，置冰上待测。
2. 植物组织：称取约 0.1 g 样本，加入 1 mL Extraction Buffer 捣碎，冰浴超声波破碎 5 min（功率 20%或 200 W，超声 3 s，间隔 7 s，重复 30 次），10,000 g，4℃离心 10 min，取上清液，置冰上待测。
3. 细胞或细菌：收集 500 万细胞或细菌到离心管内，用冷 PBS 清洗细胞，离心后弃上清，加入 1 mL Extraction Buffer，冰浴超声波破碎细胞或细菌 5 min（功率 20%或 200 W，超声 3 s，间隔 7 s，重复 30 次），然后 10,000 g，4℃离心 10 min，取上清液，置冰上待测。
4. 血清（浆）样本：直接检测。

注意：如需测定蛋白浓度，推荐使用 Abbkine 货号：KTD3001 的蛋白质定量试剂盒（BCA 法）进行样本蛋白质浓度测定。

实验步骤

1. 酶标仪或紫外分光光度计预热 30 min 以上，调节波长到 340 nm，紫外分光光度计用去离子水调零。
2. Reagent Ⅰ 25℃水浴提前预热 30 min。
3. 操作表（下述操作在 96 孔 UV 板或微量石英比色皿中操作）：

试剂	空白孔（μL）	测定孔（μL）
Reagent Ⅰ	140	140
Working Reagent	20	20
Reagent Ⅴ	20	20
样本	0	20
去离子水	20	0

4. 迅速混匀后于 340 nm 检测，记录 10 s 和 70 s 的吸光值，测定孔的记为 A_1 和 A_2，空白孔的记为 A_3 和 A_4，计算 $\Delta A_{测}=(A_1-A_2)-(A_3-A_4)$。

注意：空白孔只需测定 1 次。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 $\Delta A_{测}$ 小于 0.005，可适当增大样本量，如果 $\Delta A_{测}$ 大于 0.8，样本可用 Extraction Buffer 进一步稀释，再进行实验，乘以最终的稀释倍数。

结果计算

注意：我们为您提供的计算公式，包括推导过程计算公式和简洁计算公式。两者完全相等。建议以加粗的简洁计算公式为最终计算公式。

A. 使用 96 孔 UV 板测定的计算公式

1. 血清（浆）PDC 活力的计算

单位的定义：25℃中，每毫升血清（浆）在反应体系中每分钟催化 1 nmol NADH 氧化定义为一个酶活力单位。

Not for further distribution without written consent.Copyright © Abbkine, Inc.

PDC (U/mL)=[$\Delta A_{测}$×$V_{反总}$÷(ε×d)×10^9]÷$V_{样本}$÷T=**3,215×$\Delta A_{测}$**

2. 组织中 PDC 活力的计算

(1) 按样本蛋白浓度计算

单位的定义：25℃中，每 mg 组织蛋白在反应体系中每分钟催化 1 nmol NADH 氧化定义为一个酶活力单位。

PDC (U/mg prot)=[$\Delta A_{测}$×$V_{反总}$÷(ε×d)×10^9]÷($V_{样本}$×Cpr)÷T=**3,215×$\Delta A_{测}$÷Cpr**

(2) 按样本质量计算

单位的定义：25℃中，每 g 组织在反应体系中每分钟催化 1 nmol NADH 氧化定义为一个酶活力单位。

PDC (U/g 质量)=[$\Delta A_{测}$×$V_{反总}$÷(ε×d)×10^9]÷(W÷$V_{提取}$×$V_{样本}$)÷T=**3,215×$\Delta A_{测}$÷W**

3. 细菌或细胞中 PDC 活力的计算

按细菌或细胞数量计算

单位的定义：25℃中，每 1 万个细菌或细胞在反应体系中每分钟催化 1 nmol NADH 氧化定义为一个酶活力单位。

PDC ($U/10^4$)=[$\Delta A_{测}$×$V_{反总}$÷(ε×d)×10^9]÷($V_{样本}$÷$V_{提取}$×500)÷T=**6.4×$\Delta A_{测}$**

$V_{反总}$：反应体系总体积，0.2 mL=2×10^{-4} L，$V_{提取}$：提取液体积，1 mL；$V_{样本}$：反应体系中上清液体积，0.02 mL；ε：NADH 摩尔消光系数，6.22×10^3 L/mol/cm；d：96 孔板直径，0.5 cm；Cpr：蛋白浓度，mg/mL；T：反应时间，1 min；W：样本质量，g；500：细菌或细胞总数，500 万；10^9：单位换算系数，1 mol=10^9 nmol。

B. 使用微量石英比色皿测定的计算公式

将上述计算公式中的光径 d: 0.5 cm 调整为 d: 1 cm 进行计算即可。

注意事项

1. 提供的 Extraction Buffer 内含不溶物，使用前请摇匀。
2. 如果 1 min 变化值较小，可延长反应时间，同时注意修改计算公式的时间。

结果展示

取 0.1 g 植物叶片加入 1 mL Extraction Buffer 进行匀浆研磨，取上清，之后按照测定步骤操作，用 96 孔 UV 板测得：A_1=1.263，A_2=1.236，A_3=0.237，A_4=0.236，$\Delta A=(A_1-A_2)-(A_3-A_4)$=(1.263-1.236)-(0.237-0.236)=0.026，按样本质量计算酶活得：PDC (U/g 质量)=3,215×ΔA÷W=3,215×0.026÷0.1=835.9 U/g 质量。

相关产品

Catalog No.	Product Name
KTB1020	CheKine™ 辅酶Ⅰ NAD(H)含量检测试剂盒（微量法）
KTB1021	CheKine™ NADH 氧化酶（NOX）活性检测试剂盒（微量法）
KTB1022	CheKine™ NAD 激酶（NADK）活性检测试剂盒（微量法）
KTB1010	CheKine™ 辅酶Ⅱ NADP(H)含量检测试剂盒（微量法）

免责声明

本产品仅供科学研究使用，不适用于临床诊断。为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

Not for further distribution without written consent.Copyright © Abbkine, Inc.