

上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0664

Size: 50T/48S

丙酮酸脱氢酶 (PDH) 检测试剂盒说明书

可见分光光度法

*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

一、测定意义:

PDH (EC 4. 1. 1. 1) 广泛存在于动物、植物、微生物和培养细胞中, 是丙酮酸脱氢酶复合体(PDHC) 催化丙酮酸氧化脱羧的限速酶, 催化丙酮酸脱羧生成羟乙基-TPP, 把糖酵解和三羧酸循环连接起来。

二、测定原理:

PDH 催化丙酮酸脱氢, 同时还原 2, 6-二氯酚靛酚(2, 6-DCPIP) 从而导致 605nm 光吸收的减少。

三、需自备的仪器和用品:

可见分光光度计、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、1mL 玻璃比色皿、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水。

四、试剂的组成和配置：

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
试剂一	液体 60mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	液体 1mL×1 支	-20℃避光保存	
试剂三	液体 50mL×1 瓶	4℃保存	
试剂四	粉剂×1 支	4℃保存	
试剂五	粉剂×1 支	-20℃保存	
试剂六	粉剂×1 支	4℃保存	
试剂七	粉剂×1 支	4℃保存	
工作液的配制：临用前把试剂四、五、六、七转移到试剂三中混合溶解待用；用不完的试剂 4℃ 保存一周。			

五、操作步骤：

1. 样本的处理

称取约 0.1g 组织或收集 500 万细胞，加入 1mL 试剂一和 10μL 试剂二，用冰浴匀浆器或研钵匀浆充分研磨，4℃ 11000g 离心 10min，取上清，置冰上待测。

2. 测定步骤

- 1) 分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 605nm，蒸馏水调零。
- 2) 每个样本需要 900μL 工作液，按样本数加一取出一定量工作液于 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其他物种) 中孵育 5min。
- 3) 空白管：在 1mL 比色皿中加入 900 μL 工作液和 50μL 水，混匀，立即记录 605nm 处初始吸光值 A1 和 1min 后的吸光值 A2，计算 ΔA 空白=A1-A2。

4) 测定管：在 1mL 比色皿中加入 900 μ L 工作液和 50 μ L 样本，混匀，立即记录 605nm 处初始吸光值 A3 和 1min 后的吸光值 A4，计算 ΔA 测定 = A3 - A4。

六、PDH 活性计算按样本蛋白浓度计算

单位的定义：每 mg 组织蛋白每分钟消耗 1nmol 2,6-二氯酚靛酚定义为一个酶活性单位。

$$\text{PDH 活性 (U/mg prot)} = [(\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V \text{ 样} \times C_{\text{pr}}) \div T = 904.762 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div C_{\text{pr}}$$

(1) 按样本鲜重计算

单位的定义：每 g 组织每分钟消耗 1nmol 2,6-二氯酚靛酚定义为一个酶活性单位。

$$\text{PDH 活性 (U/g 鲜重)} = [(\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 913.81 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div W$$

(2) 按细菌或细胞密度计算

单位的定义：每 1 万个细菌或细胞每分钟消耗 1nmol 2,6-二氯酚靛酚定义为一个酶活性单位。

$$\text{PDH 活性 (U/10}^4 \text{ cell)} = [(\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 1.828 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白})$$

V 反总：反应体系总体积， 9.5×10^{-4} L； ϵ ：2,6-二氯吡啶酚摩尔消光系数， 2.1×10^4 L/mol/cm；d：比色皿光径，1cm；V 样：加入样本体积，0.05 mL；V 样总：加入试剂一和试剂二体积，1.01mL；T：反应时间，1min；C_{pr}：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；500：细菌或细胞总数，500 万。

七、注意事项：

- 1、测定过程中所有样本在冰上放置，以免变性和失活。
- 2、测定管的 ΔA 值在 0.01-0.25 之间，若测定管的 ΔA 值大于 0.25，需将样本进行稀释。
- 3、由于提取液中含有一定浓度的蛋白（约 1mg/mL）所以在测定样品蛋白浓度时需要减去提取液本身的蛋白含量。