

上海茁彩生物科技有限公司  
Shanghai zcibio technology Co., Ltd.



生化检测原理示意图

货号：ZC-S0391

规格：100管/96样

## 丙酮酸脱氢酶 (Pyruvate dehydrogenase, PDH) 试剂盒说明书

### 微量法

正式测定前务必取2-3个预期差异较大的样本做预测定

#### 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-TTP，把糖酵解和三羧酸循环连接起来。

#### 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 600nm 光吸收的减少。

#### 需自备的仪器和用品：

可见分光光度计/酶标仪、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔板、研钵、冰和蒸馏水。

#### 试剂的组成和配制：

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
试剂一	100mL×1 瓶	-20℃保存	-
试剂二	20mL×1 瓶	-20℃保存	-
试剂三	1.5mL×1 支	-20℃保存	-
试剂四	液体 20mL×1 瓶	4℃保存	-
试剂五	粉剂×1 瓶	4℃保存	-

#### 样本的前处理：

组织、细菌或细胞中胞浆蛋白与线粒体蛋白的分离：

- 1、称取约0.1g组织或收集500万细胞，加入1mL试剂一和10uL试剂三，用冰浴匀浆器或研钵匀浆。
- 2、将匀浆 600g，4℃离心 5min。
- 3、弃沉淀，将上清液移至另一离心管中，11000g，4℃离心 10min。
- 4、上清液即胞浆提取物，可用于测定从线粒体泄漏的 PDH（此步可选做）。
- 5、在步骤④的沉淀中加入200uL试剂二和2uL试剂三，超声波破碎（冰浴，功率20%或200W，超声3秒，间隔10秒，重复30次），用于线粒体PDH活性测定。

#### 测定步骤：

- 1、分光光度计或酶标仪预热30min以上，调节波长至605nm，蒸馏水调零。
- 2、样本测定
  - (1) 在试剂五中加入19mL试剂四充分溶解，置于37℃（哺乳动物）或25℃（其它物种）水浴10min；用不完的试剂 4℃保存一周；
  - (2) 在微量石英比色皿或96孔板中加10 μL样本和190 μL试剂五，混匀，立即记录605nm处初始吸光值A1和1min 后的吸光值A2，计算  $\Delta A=A1-A2$ 。

## PDH 活性计算

### a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

#### (1) 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。

$$\text{PDH 活性 (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T \\ = 952 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

#### (2) 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。

$$\text{PDH活性 (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ = 192 \times \Delta A \div W$$

#### (3) 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。

$$\text{PDH活性 (nmol/min/10}^4\text{cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ = 0.385 \times \Delta A$$

V 反总：反应体系总体积， $2 \times 10^{-4}$  L； $\epsilon$ ：2,6-二氯吡啶酚摩尔消光系数， $2.1 \times 10^4$  L/mol/cm；d：比色皿光径，1cm；V 样：加入样本体积，0.01 mL；V 样总：加入提取液体积，0.202 mL；T：反应时间，1 min；Cpr：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。

### b. 用96孔板测定的计算公式如下

#### (1) 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。

$$\text{PDH 活性 (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T \\ = 1904 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

#### (2) 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。

$$\text{PDH 活性 (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ = 384 \times \Delta A \div W$$

#### (3) 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。

$$\text{PDH 活性 (nmol/min/10}^4\text{cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.77 \times \Delta A$$

V 反总：反应体系总体积， $2 \times 10^{-4}$  L； $\epsilon$ ：2,6-二氯吡啶酚摩尔消光系数， $2.1 \times 10^4$  L/mol/cm；d：96孔板光径，0.5cm；V 样：加入样本体积，0.01 mL；V 样总：加入提取液体积，0.202mL；T：反应时间，1 min；Cpr：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。