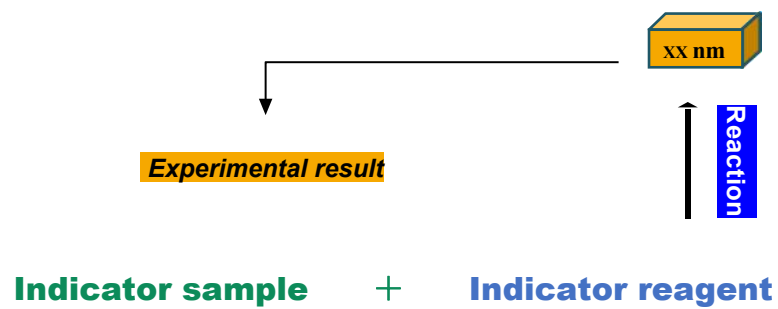


上海茁彩生物科技有限公司
Shanghai zcibio technology Co.,Ltd.



生化检测原理示意图

丙酮酸脱氢酶（PDH）活性检测试剂盒说明书

可见分光光度法

注意：正式测定之前选择2-3个预期差异大的样本做预测定。

产品内容：

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。			

产品说明：

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。

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。

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。

操作步骤：

一、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℃ 11000 g 离心 10min，取上清，置冰上待测。

二、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 900 μ L 工作液，按样本数加一取出一定量工作液于 37 $^{\circ}$ C（哺乳动物）或 25 $^{\circ}$ C（其他物种）中孵育 5min。
- 3、空白管：在 1mL 比色皿中加入 900 μ L 工作液和 50 μ L 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。

（1）三、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 1 nmol 2,6-二氯酚靛酚定义为一个酶活性单位。

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

（2）按样本鲜重计算

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

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

（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 1 nmol 2,6-二氯酚靛酚定义为一个酶活性单位。

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

V 反总：反应体系总体积，9.5 $\times 10^{-4}$ L； ϵ ：2,6-二氯酚靛酚摩尔消光系数，2.1 $\times 10^4$ L / mol /cm；
d：比色皿光径，1cm；V 样：加入样本体积，0.05 mL；V 样总：加入试剂一和试剂二体积，1.01 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。

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。