

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

（分光法 48 样）

一、产品简介：

丙酮酸脱氢酶（PDH, EC 1.2.4.1）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，把糖酵解和三羧酸循环连接起来。

丙酮酸脱氢酶（PDH）催化底物丙酮酸钠生成羟乙基-TPP，在电子传递体（PMS）存在下，使噻唑蓝（MTT）还原生成蓝色产物，通过检测该蓝色产物在 566nm 处的增加速率，即可得出 PDH 酶活性大小。

二、试剂盒的组成和配制：

试剂名称	规格	保存要求	备注
试剂一	液体 50mL×1 瓶	-20℃保存	
试剂二	液体 10mL×1 瓶	-20℃保存	
试剂三	液体μL×1 支	-20℃保存	
试剂四	粉剂 mg×2 支	4℃保存	用前甩几下使试剂落入底部，每支加 1.2mL 的蒸馏水溶解。
试剂五	粉剂 mg×4 支	4℃避光保存	用前甩几下使试剂落入底部，每支加 0.6mL 的蒸馏水溶解。一天内用完。
试剂六	粉剂 mg×2 支	4℃避光保存	用前甩几下使试剂落入底部，每支加 1.2mL 的蒸馏水溶解。一周内用完。
试剂七	液体 32mL×1 瓶	4℃保存	

三、所需的仪器和用品：

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

四、丙酮酸脱氢酶（PDH）活性测定：

1、线粒体制备（提示：整个线粒体的提取过程须保持 4℃低温环境）：

- ① 称取约 0.1g 组织或收集 500 万细菌/细胞，加入 1mL 试剂一，用冰浴匀浆器或研钵匀浆，转移至离心管后于 4℃×700g 离心 10min。
- ② 弃沉淀，上清液移至另一离心管中，4℃×12000g 离心 10min。用移液器移除上清液（上清液即胞浆提取物，可用于测定从线粒体泄漏的酶活性（此步可选做）），留下沉淀（沉淀即为线粒体）。
- ③ 在沉淀（线粒体）中加入 200μL 试剂二和 2μL 试剂三，超声波破碎（冰浴，功率 20% 或 200W，超声 3s，间隔 10 秒，重复 30 次），液体置于冰上用于丙酮酸脱氢酶活性测定。

【注】：若增加样本量，可按照组织质量（g）：提取液体积（mL）为 1：5~10 的比例进行提取，或按照细菌/细胞数量（10⁴）：提取液（mL）为 500~1000：1 的比例进行提取。

2、上机检测：

- ① 可见分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 566nm，蒸馏水调零。
- ② 所有试剂解冻至室温（25℃）。
- ③ 在 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中依次加入：

试剂名称 (μL)	测定管
样本	40
试剂四	40
试剂五	40
试剂六	40
试剂七	640
混匀, 30°C下, 10s 时于 566nm 处读取吸光值 A1, 10min 后读取吸光值 A2, ΔA=(A2-A1) 测定管- (A2-A1) 对照管。	

五、结果计算:

1、按样本蛋白浓度计算:

酶活定义: 每毫克组织蛋白每分钟还原 1 nmol 噻唑蓝 (MTT) 定义为一个酶活性单位。

$$\text{PDH 活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot})=[\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T = 107.2 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

2、按样本鲜重计算:

酶活定义: 每克组织每分钟还原 1 nmol 噻唑蓝 (MTT) 定义为一个酶活性单位。

$$\text{PDH 活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重})=[\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T = 21.7 \times \Delta A \div W$$

3、按细菌或细胞密度计算:

酶活定义: 每 1 万个细菌或细胞每分钟还原 1 nmol 噻唑蓝 (MTT) 定义为一个酶活单位。

$$\text{PDH 活性}(\text{nmol}/\text{min}/104 \text{ cell})=[\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.044 \times \Delta A$$

ε---还原型 MTT 的摩尔消光系数, $1.865 \times 10^4 \text{ L}/\text{mol}/\text{cm}$;

d---96 孔板光径, 0.5cm;

V---加入提取液体积, 0.202mL;

V1---加入样本体积, 0.01 mL;

V2---反应体系总体积, $2 \times 10^4 \text{ L}$;

T---反应时间, 20min;

W---样本质量, g;

500---细菌或细胞总数, 500 万;

Cpr---样本蛋白质浓度, mg/mL; 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。