

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(PDH_C)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
提取液	液体 120mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	粉剂 mg×2 支	4℃ 保存	使用前甩几下使试剂落入底部，每支加 1.2mL 的蒸馏水溶解。
试剂二	粉剂 mg×4 支	4℃ 避光保存	使用前甩几下使试剂落入底部，每支加 0.6mL 的蒸馏水溶解。
试剂三	粉剂 mg×2 支	4℃ 避光保存	一天内用完。 使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。

试剂四 液体 16mL×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）、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：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

1、样本制备：

① 组织样本：

称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液，进行冰浴匀浆。12000rpm，4℃ 离心 10min，取上清，置冰上待测。

【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。

② 细菌/细胞样本：

先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；取 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液；冰浴超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 20% 或 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；12000rpm，4℃ 离心 10min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照细菌/细胞数量（10⁴个）：提取液（mL）为 1:1000~5000 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 玻璃比色皿中依次加入：

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
样本	40	
蒸馏水		40
试剂一	40	40
试剂二	40	40
试剂三	40	40
试剂四	640	640
混匀, 30℃下, 10s 时于 566nm 处读取吸光值 A1, 10min 后读取吸光值 A2, $\Delta A = (A2 - A1) \text{测定管} - (A2 - A1) \text{对照管}$ 。		

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。

$$\text{PDH 活性 (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V1 \times Cpr) \div T = 53.6 \times \Delta A \div Cpr$$

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。

$$\text{PDH 活性 (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T = 53.6 \times \Delta A \div W$$

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。

$$\text{PDH 活性 (nmol/min / 10^4 cell)} = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.11 \times \Delta A$$

ϵ ---还原型 MTT 的摩尔消光系数, $1.865 \times 10^4 \text{ L/mol/cm}$; d---96 孔板光径, 1cm;

V---加入提取液体积, 1mL;

V1---加入样本体积, 0.04 mL;

V2---反应体系总体积, $8 \times 10^{-4} \text{ L}$;

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。