

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

（微板法 96 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 100mL×1 瓶 | -20℃保存 | |
| 试剂二 | 液体 20mL×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 | 使用前甩几下使试剂落入底部，每支加 0.6mL 的蒸馏水溶解。 |
| 试剂五 | 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 0.3mL 的蒸馏水溶解。一天内用完。 |
| 试剂六 | 粉剂 mg×2 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。一周内用完。 |
| 试剂七 | 液体 16mL×1 瓶 | 4℃保存 | |

三、所需的仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、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 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 566nm。
- ② 所有试剂解冻至室温（25℃）。
- ③ 在 96 孔板中依次加入：

| 试剂名称 (μL) | 测定管 |
|--|-----|
| 样本 | 10 |
| 试剂四 | 10 |
| 试剂五 | 10 |
| 试剂六 | 10 |
| 试剂七 | 160 |
| 混匀, 30°C下, 10s 时于 566nm 处读取吸光值 A1, 20min 后读取吸光值 A2, $\Delta A=A2-A1$ 。 | |

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。

$$\text{PDH 活性}(\text{nmol}/\text{min} / 10^4 \text{ cell})=[\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.044 \times \Delta A$$

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。