

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

微量法 100 管/96 样

注 意：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 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, 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。

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：

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 10 μ L 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 200 μ L 试剂二和 2 μ L 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; 用不完的试剂分装后-20℃保存, 禁止反复冻融;

(2) 在微量石英比色皿或 96 孔板中加入 10 μ L 样本和 190 μ L 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 1 nmol 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 1 nmol 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 1 nmol 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， 2×10^{-4} L； ϵ ：2,6-二氯吲哚酚摩尔消光系数， 2.1×10^4 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 1 nmol 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 1 nmol 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 1 nmol 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， 2×10^{-4} L； ϵ ：2,6-二氯吲哚酚摩尔消光系数， 2.1×10^4 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，0.202 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。
