

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

微量法 100 管/96 样

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 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。

测定原理：

PDH 催化丙酮酸脱氢，同时还原 WST-8 产生黄色物质，从而导致 450nm 光吸收的增加。

组成：

产品名称	KC004-100T/96S	Storage
试剂一：液体	100ml	-20℃
试剂二：液体	20ml	-20℃
试剂三：液体	1.5ml	-20℃
试剂四：液体	20ml	4℃
试剂五：粉剂	1 瓶	-20℃
试剂六：液体	2.5mL	4℃避光
说明书	一份	

试剂五：粉剂×1 瓶，-20℃保存，临用前加入 10mL 蒸馏水溶解待用，用不完的-20℃保存。

自备仪器和用品：

酶标仪、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、96 孔板、研钵、冰和蒸馏水。

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 10μL 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）。

最终解释权所有 © 伊势久（江苏连云港）生物科技有限责任公司，保留一切权利



5、在步骤④的沉淀中加入 200uL 试剂二和 2uL 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、酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 450nm。

2、样本测定

(1) 按照试剂四：试剂五：试剂六=100μL：60μL：20μL 的比例，依样本数量配制工作液，临用前配制。

(2) 在 96 孔板中加入 20μL 样本和 180μL 工作液，混匀，立即记录 450nm 处初始吸光值 A1 和 2min 后的吸光值 A2，计算 $\Delta A = A2 - A1$ 。

PDH 活性计算

标准曲线为 $y = 6.7928x - 0.0009$, $R^2 = 0.9991$ ；其中 y 为 ΔA ，x 为浓度 $\mu\text{mol/mL}$ 。

(1) 按样本蛋白浓度计算

单位的定义：每 mg 组织蛋白每分钟还原 1 nmol WST-8 定义为一个酶活性单位。PDH (nmol/min/mg prot) $= (\Delta A + 0.0009) \div 6.7928 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \times 1000 = 736 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$ 。

(2) 按样本鲜重计算

单位的定义：每 g 组织每分钟还原 1 nmol WST-8 定义为一个酶活性单位。

PDH (nmol/min/g 鲜重) $= (\Delta A + 0.0009) \div 6.7928 \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \times 1000 = 148.7 \times \Delta A \div W$

(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还原 1 nmol WST-8 定义为一个酶活性单位。

PDH (nmol/min/10⁴ cell) $= (\Delta A + 0.0009) \div 6.7928 \times V_{\text{反总}} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \times 1000 = 0.297 \times \Delta A \times V_{\text{反总}}$
反总：反应体系总体积，0.2mL；V 样：加入样本体积，0.02 mL；V 样总：加入提取液体积，0.202 mL；T：反应时间，2 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；1000， μmol 到 nmol 的转换系数。

