

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

(货号: G0836F 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 (10^4): 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。