

丙酮酸脱氢酶 (PDH) 活性检测试剂盒 (微量法)

产品货号: BA1060

产品规格: 100管/96样

产品说明:

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。

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605nm光吸收的减少。

注意: 实验之前建议选择2-3个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

产品内容:

试剂名称	规格	保存条件
试剂一	液体110mL×1瓶	4℃
试剂二	液体1mL×1瓶	-20℃
试剂三	液体20mL×1瓶	4℃
试剂四	粉剂×1支	4℃
试剂五	粉剂×1支	-20℃
试剂六	粉剂×1支	4℃
试剂七	液体11mg×1支	4℃

溶液的配制:

试剂六: 临用前加入1mL蒸馏水备用。

工作液的配制: 临用前把试剂四、试剂五、0.5mL试剂六、试剂七转移到试剂三中混合溶解待用; 用不完的试剂4℃保存一周。

所需的仪器和用品:

可见分光光度计/酶标仪、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、微量玻璃比色皿/96孔板、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水。

操作步骤:

一、样本处理 (可适当调整待测样本量, 具体比例可以参考文献)

称取约0.1g组织或收集500万细胞或细菌, 加入1mL试剂一和10 μ L试剂二, 用冰浴匀浆器或研钵匀浆充分研磨, 4℃11000g离心10min, 取上清, 置冰上待测。

二、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. 每个样本需要180 μ L工作液, 按样本数取出一定量的工作液于37℃ (哺乳动物) 或25℃ (其他物种) 中水浴10min。
3. 空白管: 在微量比色皿或96孔板中加入180 μ L工作液和10 μ L水, 混匀, 立即记录605nm处初始吸光值A1和1min后的吸光值 A2, 计算 $\Delta A_{\text{空白}} = A1 - A2$ 。
4. 测定管: 在微量比色皿或96孔板中加入180 μ L工作液和10 μ L样本, 混匀, 立即记录605nm处初始吸光值A3和



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司
Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话: 400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

1min后的吸光值A4，计算 ΔA 测定=A3-A4。

二、PDH活性计算

a. 用微量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1nmol 2,6-二氯酚靛酚定义为一个酶活性单位。

$$\text{PDH活性 (U/mg prot)} = [(\Delta A \text{测定} - \Delta A \text{空白}) \times V \text{反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V \text{样} \times \text{Cpr}) \div T \\ = 904.762 \times (\Delta A \text{测定} - \Delta A \text{空白}) \div \text{Cpr}$$

2. 按样本质量计算

单位的定义：每g组织每分钟消耗1nmol 2,6-二氯酚靛酚定义为一个酶活性单位。

$$\text{PDH活性 (U/g质量)} = [(\Delta A \text{测定} - \Delta A \text{空白}) \times V \text{反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V \text{样} \div V \text{样总}) \div T \\ = 913.81 \times (\Delta A \text{测定} - \Delta A \text{空白}) \div W$$

3. 按细菌或细胞数量计算

单位的定义：每1万个细菌或细胞每分钟消耗1nmol 2,6-二氯酚靛酚定义为一个酶活性单位。

$$\text{PDH活性 (U/10}^4 \text{cell)} = [(\Delta A \text{测定} - \Delta A \text{空白}) \times V \text{反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V \text{样} \div V \text{样总}) \div T \\ = 1.828 \times (\Delta A \text{测定} - \Delta A \text{空白})$$

V反总：反应体系总体积， 1.9×10^{-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，0.01mL；V样总：加入试剂一和试剂二体积，1.01mL；T：反应时间，1min；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组织蛋白在反应体系中每分钟消耗1nmol 2,6-二氯酚靛酚定义为一个酶活性单位。

$$\text{PDH活性 (U/mg prot)} = [(\Delta A \text{测定} - \Delta A \text{空白}) \times V \text{反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (\text{Cpr} \times V \text{样}) \div T \\ = 1809.524 \times (\Delta A \text{测定} - \Delta A \text{空白}) \div \text{Cpr}$$

2. 按样本质量计算

单位的定义：每g组织在反应体系中每分钟消耗1nmol 2,6-二氯酚靛酚定义为一个酶活性单位。

$$\text{PDH活性 (U/g质量)} = [(\Delta A \text{测定} - \Delta A \text{空白}) \times V \text{反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V \text{样} \div V \text{样总} \times W) \div T \\ = 1827.62 \times (\Delta A \text{测定} - \Delta A \text{空白}) \div W$$

3. 按细菌或细胞数量计算

单位的定义：每1万个细菌或细胞在反应体系中每分钟消耗1nmol 2,6-二氯酚靛酚定义为一个酶活性单位。

$$\text{PDH活性 (U/10}^4 \text{cell)} = [(\Delta A \text{测定} - \Delta A \text{空白}) \times V \text{反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V \text{样} \div V \text{样总} \times 500) \div T \\ = 3.655 \times (\Delta A \text{测定} - \Delta A \text{空白})$$

V反总：反应体系总体积， 1.9×10^{-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，0.01mL；V样总：加入试剂一和试剂二体积，1.01mL；T：反应时间，1min；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。

注意事项：

1. 测定过程中所有样本在冰上放置，以免变性和失活。
2. 测定管的 ΔA 值在0.01-0.25之间，若测定管的 ΔA 值大于0.25，需将样本进行稀释。
3. 由于试剂一中含有一定浓度的蛋白（约1mg/mL），所以在测定样品蛋白浓度时需要减去本身的蛋白含量。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司
Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱：saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com