

## 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0.6mL×1瓶	-20℃
试剂三	液体7.5mL×2瓶	4℃
试剂四	液体13mL×1瓶	4℃
试剂五	粉剂×2支	-20℃
试剂六	液体1mL×1支	4℃
试剂七	液体4mL×1瓶	4℃

溶液的配制：

试剂二：为易挥发试剂，用完后尽快密封，-20℃保存。

工作液的配制：临用前把5.75mL试剂四、一支试剂五、0.45mL试剂六、1.75mL试剂七转移到一瓶试剂三中混合溶解待用（共15.45mL，约85T）；用不完的试剂-20℃分装保存，可保存4周。避免反复冻融。

### 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）

组织：称取约0.1g组织，加入1mL试剂一和10 μL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。

细胞或者细菌样本：先收集500万细胞或细菌到离心管内，离心后弃上清；之后加入1mL试剂一和10 μL试剂二，冰浴超声波破碎细菌（功率200W，超声3s，间隔7s，总时间5min）；然后11000g，4℃，离心10min，取上清置于冰上待测。

血清（浆）及其它液体样本：直接检测。若溶液有浑浊则离心后去上清进行测定。

#### 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，分光光度计蒸馏水调零。
2. 每个样本需要180 μL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



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

10min。

- 空白管：在微量比色皿或96孔板中加入180 $\mu$ L工作液和10 $\mu$ L水，混匀，立即记录605nm处10s处吸光值A1和1min10s后的吸光值A2，计算 $\Delta A$ 空白=A1-A2。空白管只需测1-2次。
- 测定管：在微量比色皿或96孔板中加入180 $\mu$ L工作液和10 $\mu$ L样本，混匀，立即记录605nm处10s处吸光值A3和1min10s后的吸光值A4，计算 $\Delta A$ 测定=A3-A4。

### 三、PDH活性计算

#### a.用微量比色皿测定的计算公式如下

- 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。

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

$$= 904.762 \times (\Delta A \text{测定} - \Delta A \text{空白}) \div C \text{pr}$$

- 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。

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

$$= 913.81 \times (\Delta A \text{测定} - \Delta A \text{空白}) \div W$$

- 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。

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

$$= 1.828 \times (\Delta A \text{测定} - \Delta A \text{空白})$$

- 按样本体积计算

单位的定义：每mL液体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。

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

V反总：反应体系总体积，1.9 $\times 10^{-4}$ L； $\epsilon$ ：2,6-二氯吡啶酚摩尔消光系数，2.1 $\times 10^4$ 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

- 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。

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

$$= 1809.524 \times (\Delta A \text{测定} - \Delta A \text{空白}) \div C \text{pr}$$

- 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。

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

$$= 1827.62 \times (\Delta A \text{测定} - \Delta A \text{空白}) \div W$$

- 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。

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

$$= 3.655 \times (\Delta A \text{测定} - \Delta A \text{空白})$$

- 按样本体积计算

单位的定义：每mL液体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。

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

$$= 1809.524 \times (\Delta A \text{测定} - \Delta A \text{空白})$$



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

V反总：反应体系总体积， $1.9 \times 10^{-4} \text{L}$ ； $\epsilon$ ：2,6-二氯吡啶酚摩尔消光系数， $2.1 \times 10^4 \text{L/mol/cm}$ ；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并于2小时内检测，以免变性和失活。
2. 测定管的 $\Delta A$ 值在0.01-0.25之间，若测定管的 $\Delta A$ 值大于0.25，需将样本进行稀释。计算公式中乘以稀释倍数。若测定管的 $\Delta A$ 值小于0.01，需加大样本量后重新测定，注意同步修改计算公式。
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试剂一的蛋白含量。



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>